

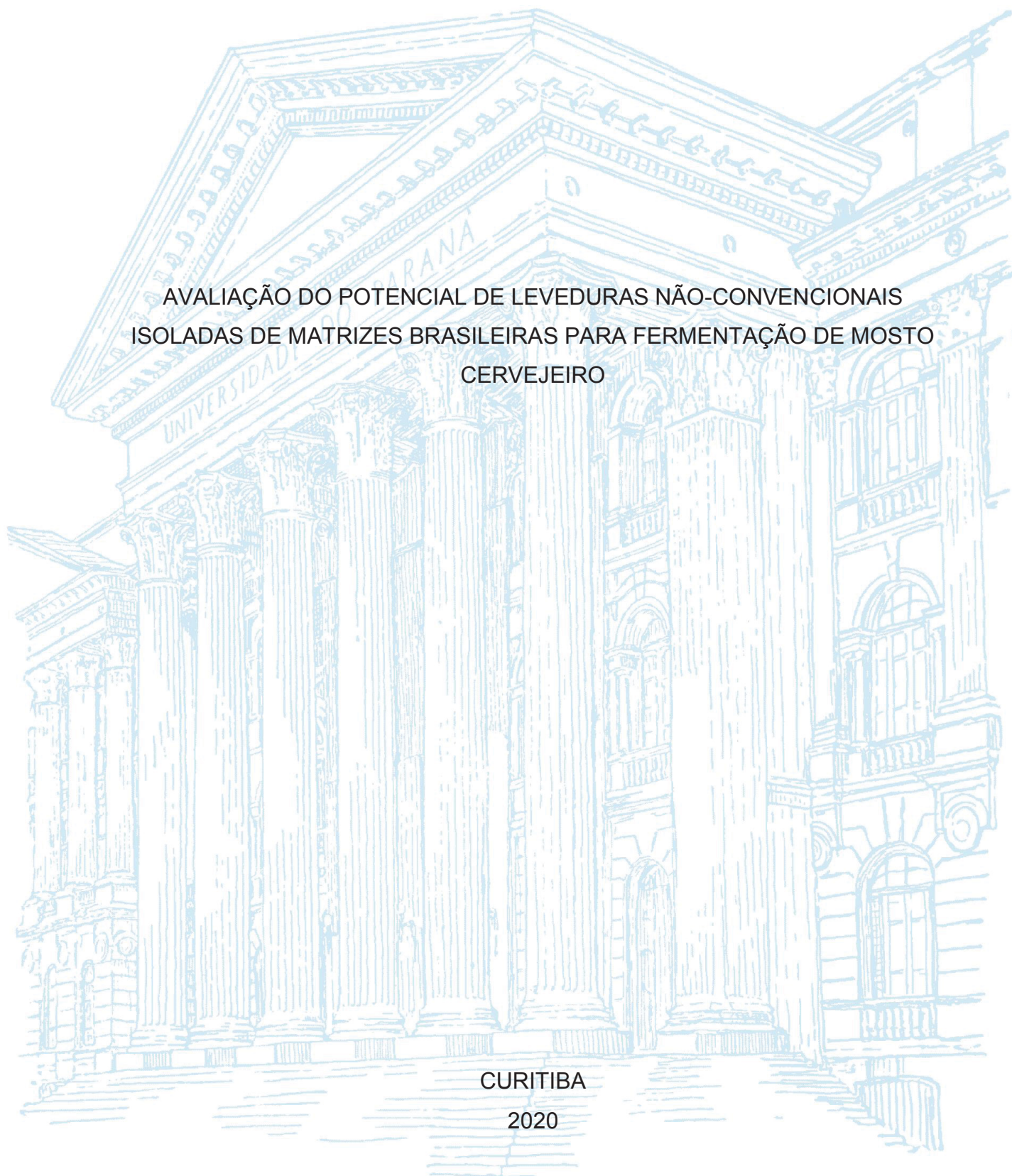
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EVERTON HENRIQUE DA SILVA PEREIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LEVEDURAS NÃO-CONVENCIONAIS  
ISOLADAS DE MATRIZES BRASILEIRAS PARA FERMENTAÇÃO DE MOSTO  
CERVEJEIRO

CURITIBA

2020



EVERTON HENRIQUE DA SILVA PEREIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LEVEDURAS NÃO-CONVENCIONAIS  
ISOLADAS DE MATRIZES BRASILEIRAS PARA FERMENTAÇÃO DE MOSTO  
CERVEJEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientador(a): Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Eugenia Duarte Nosedá

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Pereira, Everton Henrique da Silva.

Avaliação do potencial de leveduras não convencionais isoladas de matrizes brasileiras para fermentação de mosto cervejeiro. / Everton Henrique da Silva Pereira. – Curitiba, 2020.

89 f. : il.

Orientador: Miguel Daniel Nosedá.

Coorientadora: Maria Eugenia Duarte Nosedá.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. Leveduras. 2. Cerveja. 3. Fermentação. 4. Bioprospecção. 5. Biodiversidade. I. Título. II. Nosedá, Miguel Daniel. III. Nosedá, Maria Eugenia Duarte. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 663.42

ATA Nº492

## ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)

No dia vinte e cinco de setembro de dois mil e vinte às 15:00 horas, na sala virtual, Plataforma Microsoft Teams, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação do mestrando **EVERTON HENRIQUE DA SILVA PEREIRA**, intitulada: **Avaliação do potencial de leveduras não convencionais isoladas de matrizes brasileiras para fermentação de mosto cervejeiro.**, sob orientação do Prof. Dr. MIGUEL DANIEL NOSEDA. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: MIGUEL DANIEL NOSEDA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), AGENOR VALADARES SANTOS (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ), MICHELE RIGON SPIER (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, MIGUEL DANIEL NOSEDA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 25 de Setembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

29/09/2020 11:07:29.0

MIGUEL DANIEL NOSEDA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

01/10/2020 07:53:18.0

AGENOR VALADARES SANTOS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ)

Assinatura Eletrônica

25/09/2020 20:19:41.0

MICHELE RIGON SPIER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ )

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **EVERTON HENRIQUE DA SILVA PEREIRA** intitulada: **Avaliação do potencial de leveduras não convencionais isoladas de matrizes brasileiras para fermentação de mosto cervejeiro.**, sob orientação do Prof. Dr. MIGUEL DANIEL NOSEDA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 25 de Setembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

29/09/2020 11:07:29.0

MIGUEL DANIEL NOSEDA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

01/10/2020 07:53:18.0

AGENOR VALADARES SANTOS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ)

Assinatura Eletrônica

25/09/2020 20:19:41.0

MICHELE RIGON SPIER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ )

Para Anadir Lucrecia da Silva Pereira e Ednaldo Fernandes Pereira,  
que deram o Amor e tudo que preciso.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos professores Dr. Miguel Daniel Nosedá e Dra. Maria Eugenia Nosedá, pela orientação e suporte durante todo o período de execução desse trabalho.

À Bio4 Soluções biotecnológicas®, nas figuras do MSc. Marcelo Calide Barga e Dra. Bianca Eli Della Bianca, pelo suporte e sugestões feitas durante a execução desse trabalho.

À Professora Dra. Vania Aparecida Vicente e MSc. Bruna Jacomel, pela contribuição na identificação das cepas investigadas.

Aos Professores Dr. Agenor Valadares, Dra. Luciana Xavier e a pesquisadora Dra. Ludmila Conon, pela contribuição na elaboração do projeto e auxílio no acesso às matrizes usadas nesse trabalho.

À Professora Dra. Tania Maria Bordin Bonfim e Professora Dra. Michele Rigon Spier pelas avaliações e contribuições a esse trabalho a partir do projeto de pesquisa e relatório parcial, respectivamente.

Aos Professores Dr. Luciano Campestrini e Dra. Juliana Maurer, pela colaboração e sugestões sobre os aspectos que envolvem a cromatografia líquida.

Aos colegas de laboratório 248 e E3, pelo apoio e discussões durante todo esse processo.

Aos técnicos Dr. Mauricio Passos e Dra. Flávia Degaut, pelo auxílio e orientação acerca dos processos de cromatografia.

À minha companheira, Juliane Cardoso da Silva, pela paciência, suporte emocional e grande ajuda na revisão desse trabalho.

E aos meus pais, Anadir Lucrécia da Silva Pereira e Ednaldo Fernandes Pereira, que me trouxeram até aqui.



## RESUMO

As leveduras de cerveja não são apenas o fator chave para a fermentação da cerveja, mas também um elemento potencial de inovação, devido sua diversidade e impactos sensoriais no produto final, implicando na diversificação de produtos, tão exigida nessa indústria. A bioprospecção de leveduras cervejeiras, no entanto, foi negligenciada por muito tempo e apenas recentemente intensificada. Além disso, em termos de biotecnologia, sabe-se que a biodiversidade pode representar uma grande e valiosa fonte de novas tecnologias e que pouco se sabe sobre as aplicações biotecnológicas da microbioma amazônica devido à sua ampla abrangência. Para abordar essa lacuna, o presente estudo investiga o potencial de leveduras não-convencionais isoladas no bioma Amazônia e outras regiões brasileiras na fermentação do mosto de cerveja a partir de testes de triagem: como parâmetros de crescimento, resistência ao etanol, floculação, consumo de carbono e investigações de caracterização da produção de subprodutos de fermentação por HPLC-RID e GC-FID. Aqui, observações empíricas mostraram aspectos das cepas como tolerâncias alcoólicas (entre 5 - 10% de etanol v / v), alto consumo de glucose e maltose, atenuações entre 50 - 60% e perfis organolépticos sublinhados pela produção de compostos ativos, como álcoois superiores. Portanto, salvo as condições de laboratório, os resultados dessas cepas sugerem fortemente como potenciais candidatos a cervejeiros.

Palavras-chave: Leveduras. Cerveja. Fermentação. Bioprospecção. Biodiversidade.



## **ABSTRACT**

Brewing yeasts are not only the key factor for beer fermentation but also a potential element of innovation since its diversity and sensorial impacts in the final product, therefore implying in the product diverseness demanded in that industry. Brewing yeast bioprospecting research, however, is been neglected for a long time and just recently intensified. In addition, in terms of biotechnology, is knows that biodiversity could represent a huge and valuable source for new technology and that little is known about amazon microbiome biotechnological applications due to its wide scope. To address this gap, the present study investigates Amazon biome and other Brazilian isolated non-conventional yeasts potential on brewing wort fermentation from screening tests as growth parameters, ethanol resistance, flocculation, carbon consumption and byproducts production characterization investigations by HPLC-RID and GC-FID. Here, empirical observations showed strains aspects like alcoholic tolerances (between 5 - 10% ethanol v/v), high glucose and maltose uptakes, attenuations between 50 - 60%, and organoleptic profiles underline by active compounds production such as higher alcohols. Therefore, saved at laboratory conditions, those strains outcomes strongly suggest it as potential brewer candidates.

Keywords: Yeasts. Beer. Fermentation. Bioprospecting. Biodiversity.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ASSIMILAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS DO MOSTO EM LEVEDURA.....	15
FIGURA 2 – MANDIOCA NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DO TUCUPI.....	24
FIGURA 3 – PLANTA DE FERMENTAÇÃO.....	32
FIGURA 4 – AVALIAÇÃO DE ASSIMILAÇÃO DE MALTOSE EM PLACA .....	42

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – ÁRVORE FILOGENÉTICA A PARTIR DO ITS (PARTE I) .....	36
GRÁFICO 2 – ÁRVORE FILOGENÉTICA A PARTIR DO ITS (PARTE II) .....	37
GRÁFICO 3 - CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO E CONCENTRAÇÃO CELULAR ....	40
GRÁFICO 4 - COMPARAÇÃO ENTRE MÉDIAS DE $\mu_{\text{MÁX}}$ EM YDP .....	43
GRÁFICO 5 - PERCENTUAIS DE FLOCULAÇÃO .....	47
GRÁFICO 6 - VITALIDADE E VIABILIDADE CELULAR .....	49

## Lista de Tabelas

TABELA 1 – EFEITOS DANOSOS DO ETANOL EM LEVEDURAS. ....	10
TABELA 2 – GENES RELACIONADOS À FLOCULAÇÃO .....	13
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO .....	14
TABELA 4 - COMPOSTOS ATIVOS E LIMIARES ORGANOLÉPTICOS.....	20
TABELA 5 - CEPAS INVESTIGADAS .....	25
TABELA 6 - ESPECIFICAÇÕES E COLUNA PARA DETERMINAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS POR HPLC-RID .....	31
TABELA 7 - ESPECIFICAÇÕES E COLUNA PARA DETERMINAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE FERMENTAÇÃO POR GC-FID .....	34
TABELA 8 - CONJUNTO DE CEPAS IDENTIFICADAS .....	39
TABELA 9 - CRESCIMENTO EM ESTRESSE ALCOÓLICO .....	44
TABELA 10 - ASSIMILAÇÃO E MELIBIOSE EM MEIO SÓLIDO.....	45
TABELA 11 - CONSUMO DE CARBOIDRATO DO MOSTO .....	50
TABELA 12 - TEOR ALCOÓLICO E ATENUAÇÃO APARENTE .....	51
TABELA 13 - SUBPRODUTOS DE FERMENTAÇÃO DO MOSTO .....	54
TABELA 14 - RESUMO DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DAS CEPAS AVALIADAS .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

v/v	- Volume por volume
KL	- Quilo litro
$\mu\text{m}$	- Micrometros
4VG	- 4-vinil guaiacol
PAD1	- Peptidilarginina Desiminase Tipo I
FDC1	- Ácido ferúlico Decarboxilase Tipo I
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
$\mu\text{MÁX}$	- Taxa específica máxima de crescimento
EDTA	- Ácido etilemodiamino tetra-acético
FLO	- Gene proteína de adesão celular
NewFLO	- Fenótipo de proteína floricaula
MI	- Insensível a manose
HXT	- Transportador hexose permease
MAL	- Proteína de ligação de maltodextrina
MEL1	- Precursor da alfa-galactosidase 1
ADH	- Álcool desidrogenase
NAD	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo
BAT	- Gene mitocondrial aminotransferase de cadeia ramificada
ARO	- Gene aminotransferase aromática
PDC	- Enzima piruvato descarboxilase
AAT	- Aspartato aminotransferase
ATF	- Álcool O-acetiltransferase 1
EEB1	- Etil ésteres de ácido graxos sintase/esterase 1
EHT1	- Etil ésteres de ácido graxos sintase/esterase 2
YPD	- Extrato de levedura – Peptona – Dextrose
SISGEN	- Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
M/V	- Massa por volume
$\mu\text{L}$	- Microlitro
G	- Força gravitacional equivalente
CTAB	- Brometo de cetiltrimetilamônio
CIA	- Clorofórmio-álcool isoamílico

DO	- Densidade óptica
nm	- Nanômetros
g/L	- Grama por litro
RPM	- Rotações por minuto
YNB	- <i>Yeast Nitrogen Base</i>
X- $\alpha$ -GAL	- 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\alpha$ -D-galactosídeo
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência, traduzido do inglês
RID	- Detector de índice de refração
ADA	- Atenuação aparente
ABV	- Álcool por volume
ER	- Extrato residual
EO	- Extrato original
GO	- Gravidade específica original
GF	- Gravidade específica final
GC	- Cromatografia de fase gasosa
FID	- Detector de ionização de chama
EBC	- Convenção Cervejeira Europeia
ITS	- <i>Internal transcribed spacer</i>
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
CBS	- <i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
R <sup>2</sup>	- Coeficiente de determinação
ANOVA	- Análise de variância
IC	- Intervalo de confiança

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

°C - Graus Celsius

°P - Graus Plato

® - Marca registrada comercial

™ - Marca registrada comercial, inglês

Λ - Comprimento de onda

n° - Número



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 JUSTIFICATIVA .....	2
1.2 OBJETIVOS .....	3
1.2.1 Objetivo geral .....	3
1.2.2 Objetivos específicos.....	3
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
2.1 MICROBIOLOGIA CERVEJEIRA .....	4
2.1.1 Leveduras cervejeiras .....	4
2.1.2 Leveduras não-convencionais .....	6
2.1.3 Cinética de fermentação.....	9
2.1.4 Tolerância Alcoólica .....	9
2.1.5 Floculação .....	11
2.2 BIOQUÍMICA CERVEJEIRA .....	13
2.2.1 Composição do mosto Cervejeiro.....	13
2.2.2 Glucose .....	14
2.2.3 Maltose e Maltotriose .....	16
2.2.4 Melibiose .....	17
2.2.5 Produção de Etanol .....	19
2.2.6 Metabólitos secundários da fermentação .....	20
2.2.6.1 Álcoois superiores .....	21
2.2.6.2 Ésteres.....	22
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1 CEPAS .....	23
3.1.1 Isolamento a partir de Mandioca .....	23
3.1.2 Registro das cepas.....	24
3.1.3 Ativação e manutenção .....	25
3.1.4 Cepas Controle.....	25
3.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS .....	25
3.2.1 Extração de DNA.....	25
3.2.2 Identificação por alinhamento filogenético.....	26
3.3 CALIBRAÇÃO DE ABSORBÂNCIA E CONCENTRAÇÃO CELULAR .....	27
3.4 ASSIMILAÇÃO DE MALTOSE .....	27

3.5 COMPARAÇÃO DA TAXA ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO .....	27
3.6 TOLERÂNCIA ALCOÓLICA .....	28
3.7 ASSIMILAÇÃO DE MELIBIOSE .....	28
3.8 ENSAIO DE FLOCULAÇÃO .....	29
3.9 PROPAGAÇÃO .....	30
3.10 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE CARBOIDRATOS POR HPLC-RID .....	30
3.11 ATENUAÇÃO APARENTE E ESTIMATIVA DE TEOR ALCOÓLICO .....	32
3.12 DETERMINAÇÃO DOS SUBPRODUTOS DE FERMENTAÇÃO POR GC-FID .....	33
<b>4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
4.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS .....	34
4.2 CURVAS DE CALIBRAÇÃO DE DENSIDADE ÓPTICA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR .....	38
4.3 ISOLADOS A PARTIR DA MANDIOCA .....	40
4.4 ASSIMILAÇÃO DE MALTOSE .....	40
4.5 TAXA ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO ( $\mu_{MAX}$ ) .....	42
4.6 TOLERÂNCIA ALCOÓLICA .....	44
4.7 ASSIMILAÇÃO DE MELIBIOSE .....	45
4.8 ENSAIO DE FLOCULAÇÃO COM EDTA .....	46
4.9 PROPAGAÇÃO CELULAR .....	48
4.10 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE CARBOIDRATOS POR HPLC-RID .....	50
4.11 ATENUAÇÃO APARENTE E ESTIMATIVA DE TEOR ALCOÓLICO .....	51
4.12 QUANTIFICAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE FERMENTAÇÃO POR GC-FID .....	52
4.13 CONCLUSÃO .....	56
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>58</b>
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	58
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO 1 – IMAGENS .....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO 2 – CODIGO R .....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO 3 – TABELAS E GRÁFICOS .....</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de cerveja é uma atividade que passou por mudanças ao longo dos seus milhares de anos de história. Os processos de fermentação eram incipientes e, por isso, não controlados. Havia uma grande variedade de insumos, devido à localização e à sazonalidade de onde eram realizados. Historicamente houve pouco controle e a alta variabilidade de microrganismos também seguia a cartilha de variedade e não especificidade dos demais insumos. Afinal o controle microbiológico é um conceito bem mais recentemente adicionado ao processo. Hoje, entretanto, a tecnologia vem sendo aplicada para otimizar os processos e entregar qualidade e inovação para um mercado cada vez mais exigente (Fox, 2020).

Alguns dos indicadores de como a indústria cervejeira tem mudado são as recentes investigações acerca de leveduras não-convencionais como agentes de fermentação e/ou de potencialização de aromas como diferencial em seus produtos (Gibson et al., 2020). As leveduras fazem muito mais pelo produto final do que somente a conversão de açúcares em álcool, em especial as não-convencionais, possibilitando a produção de novos estilos de cerveja (Canonico *et al.*, 2020).

O Brasil, com seus vários biomas e sua extensão continental, é reconhecido por ter uma das maiores biodiversidades no mundo, contendo aproximadamente de 15 a 20% de todas as espécies da Terra (Duden *et al.*, 2020). É, portanto, uma fonte gigantesca de prospecção de novas cepas de microrganismos, capazes de impactar, entre outras coisas, na biotecnologia desenvolvida nacionalmente. Neste trabalho, a partir de fontes ricas em substratos semelhantes bioquimicamente aos encontrados no mosto cervejeiro, foram investigadas cepas acerca da possibilidade de uso no processo fermentativo de cervejas. A ampla variedade de espécies devido à grande diversidade ambientes de origem é ponto relevante de como foi possível a construção desse trabalho, e razão pela qual o mesmo, e demais trabalhos com propostas de investigação da biodiversidade nacional, tem valor para além do potencial econômico, mas também de valorização simbólica.

Para apontar características relacionadas ao potencial de uso dessas leveduras em processos na indústria cervejeira, é necessária a reunião de diferentes métodos de investigação, sejam esses de triagem e/ou caracterização de perfis não excludentes, ou seja, perfis que informam características, mas não necessariamente excluem o uso. Com esse objetivo, foi realizado um criterioso levantamento na

literatura científica, analisando publicações Canonico et al. (2020) e Holt et al. (2018) e Michel (2017), que trazem informações importantes acerca de aspectos relevantes como viabilidade de crescimento em ambientes de fermentação cervejeira, tolerância alcoólica, habilidade de floculação, consumo e atenuação aparente analisando publicações (que serão apresentados no item 2 REVISÃO DE LITERATURA) de carboidratos presentes no mosto cervejeiro.

O presente trabalho apresenta os dados experimentais obtidos e pretende, a partir do processamento desses dados e da literatura, inferir quais cepas podem apresentar características de destaque para um potencial uso na indústria da cervejeira.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Dado o aumento do segmento de mercado de produção de cervejas a produção científica acerca dos processos envolvidos se faz relevante atualmente. De acordo com dados do relatório do *Kirin Holdings* de 2018, o Brasil ocupou, em 2017, a terceira posição no mundo em volume de produção cervejeira, com 14.000.000 kL de cerveja, o que significava cerca de 7,3% da produção mundial, atrás apenas da China e dos Estados Unidos, com 39.788.100 kL e 21.775.300 kL de cerveja, respectivamente (KIRIN, 2018). Já no contexto brasileiro, o número de registro de produtos concedidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no ano de 2019, foi de aproximadamente 9950, para cerveja e chope (MAPA, 2019). Um setor de tanta expressão que, em 2019, ganhou reconhecimento do governo brasileiro, sendo instalada no MAPA a Câmara da Cerveja, com objetivo de consolidar o mercado (Lima, 2019).

A identificação de novas espécies de leveduras cervejeiras foi, por algum tempo, negligenciada diante à prospecção e à otimização do uso de outros ingredientes relacionados à bebida, como diversas composições de malte, lúpulos e outros adjuntos agrícolas (Osburn *et al.*, 2018). Entretanto, recentes investigações têm focado na prospecção de cepas não-convencionais como fonte ampla e diversa para produção de novos estilos, bem como em responder à crescente demanda por inovação e eficiência no mercado cervejeiro (Canonico *et al.*, 2020).

Diante desse cenário, o presente trabalho tem como foco de pesquisa contribuir com a elucidação do potencial de cepas de leveduras não-convencionais isoladas de matrizes brasileiras para a indústria cervejeira, promovendo valorização da biodiversidade brasileira em conjunto com alternativas inovadoras ao mercado cervejeiro.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de leveduras não-convencionais isoladas de matrizes brasileiras para fermentação de mosto cervejeiro.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Isolar leveduras a partir de matrizes brasileiras;
- Realizar triagem das cepas quanto à assimilação de carboidratos;
- Realizar triagem das cepas quanto a sua velocidade de crescimento;
- Avaliar o crescimento das cepas de leveduras frente ao estresse alcoólico;
- Avaliar as cepas de leveduras quanto à assimilação de melibiose;
- Determinar o perfil de floculação das cepas em estudo;
- Analisar o perfil de consumo de carboidratos fermentescíveis das cepas em mosto cervejeiro na fase de fermentação primária;
- Analisar os perfis de produtos de fermentação primária das cepas em mosto cervejeiro;
- Determinar o perfil de atenuação das cepas em mosto cervejeiro;
- Avaliar o potencial de uso das cepas como agentes de fermentação cervejeira.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MICROBIOLOGIA CERVEJEIRA

#### 2.1.1 Leveduras cervejeiras

Leveduras são fungos unicelulares, com diâmetro entre 5-10 µm e formato esférico a oval, amplamente explorados e um dos grupos de microrganismos economicamente mais importantes do ponto de vista biotecnológico. O gênero *Saccharomyces*, um dos mais intensamente estudados, é o principal agente de fermentação no processo cervejeiro (Boulton; Quain, 2008), convertendo o açúcar disponível no mosto em etanol, dióxido de carbono e uma série de compostos secundários importantes na composição do produto final (Speers & Forbes, 2015).

Há milhares de anos, as leveduras são usadas para fermentar bebidas, tais como vinho e cerveja. O primeiro documento encontrado que apresenta o processo para obtenção de uma bebida próxima à cerveja foi escrito pelos Sumérios há 6000 anos (Michel, 2017); já o uso de leveduras para se obter algo parecido com o que conhecemos hoje como vinho data do período Neolítico, pelo menos 9000 mil anos atrás na China (Duan *et al.*, 2018). A domesticação de espécies de leveduras foi intensa e levou à especialização de cada cepa ao seu uso. Em diferentes regiões do mundo, seja na fermentação de alimentos ou bebidas, a domesticação nos trouxe a um estado em que a diferenciação entre leveduras associadas ao homem e leveduras selvagens pode ser nitidamente observada filogeneticamente (Fay; Benavides, 2005).

No que diz respeito a leveduras cervejeiras, a especialização nos levou a classificá-las basicamente em dois grupos: leveduras *ale* e leveduras *lager*, relativos às características de fermentação, como faixas de temperaturas, perfis de assimilação de carboidratos e também características de ancestralidade filogenética. As fermentações e as cervejas, por consequência, também têm a classificação *ale* e *lager*, relacionada ao tipo de levedura utilizada; entretanto, podem também ser classificadas em termos como **fermentação primária**: fase principal de fermentação, de propagação a fermentação; **fermentação secundária**: segunda fermentação, pelas mesmas cepas ou não, geralmente relacionada à maturação da cerveja (Petelkov *et al.*, 2020); ou **fermentações mistas, espontâneas e co-fermentações**:

quando, a princípio, não é utilizada uma única cultura de células (Capece *et al.*, 2018; Holt *et al.*, 2018; Michel, 2017 e Canonico *et al.*, 2017).

De acordo com a classificação *ale* vs *lager*, em relação às diferenças fenotípicas, cepas *ale* apresentam temperatura de fermentação entre 18-25 °C, temperatura possível de propagação de 37 °C ou mais, e geralmente não são capazes de assimilar o dissacarídeo D-melibiose ( $\alpha$ -D-galactose-(1→6)-D-glucose). Cepas *lager*, por outro lado, apresentam temperatura de fermentação entre 8 - 15 °C, temperatura ótima de propagação abaixo de 34 °C, e geralmente são capazes de assimilar D-melibiose (Stewart, 2017).

A faixa de baixas temperaturas (8 - 15 °C), relacionadas às leveduras *lager*, estaria relacionada a sua ancestralidade híbrida, herdando um perfil criofílico de *Saccharomyces eubayanus* combinado à capacidade fermentativa e de utilização de açúcares de *S. cerevisiae* (Hebly *et al.*, 2015; Krogerus *et al.*, 2017). Com a domesticação de leveduras não-convencionais e prospecção de outras espécies, a distinção entre *ale* e *lager* baseada na assimilação ou não-assimilação de melibiose tem se tornado cada vez menos relevante, apesar de ainda utilizada - como veremos mais adiante ao falarmos sobre melibiose.

Outra característica comumente discutida para diferenciar cepas *ale* e *lager* é a localização das células durante o processo de fermentação. Cepas *ale*, devido a diferenças fisiológicas, apresentariam uma superfície mais hidrofóbica e, por isso, seriam mais suscetíveis a aderir a bolhas de dióxido de carbono, se localizando principalmente no topo do meio fermentativo, enquanto cepas *lager* floculariam e sedimentariam durante o processo, permanecendo principalmente na base do reator (Dengis *et al.*, 1995). Entretanto, o uso de fermentadores cilíndricos e a seleção artificial fizeram com que algumas cepas *ale* demonstrassem comportamento esperado de *lager*, enfraquecendo esse fator de comparação (Boulton; Quain, 2008).

De uma perspectiva filogenética, as leveduras *ale* representam um grande espectro de linhagens de *S. cerevisiae* com distinções genotípicas significativas entre si, tanto dentro do grupo de linhagens já domesticadas quanto no de linhagens selvagens (Gallone *et al.* 2016; Gonçalves *et al.*, 2016). A grande variedade de linhagens favorece a diversidade de metabólitos secundários, resultando em diferentes impactos sensoriais, em especial em cervejas, independentemente de outros insumos aplicados. Exemplo disso é a seleção de leveduras capazes de descarboxilar o 4-vinil guaiacol (4VG), um aroma indesejável derivado do ácido



ferúlico, cuja descrição sensorial remete à luva cirúrgica; a ocorrência desse tipo de fenótipo, que está relacionada a dois genes (PAD1 e FDC1), é observada principalmente em indústrias, como a cervejeira, porém não em isolados usados para transformação de biodiesel ou não-industriais (Gallone *et al.*, 2016 e Gonçalves *et al.*, 2016).

Por outro lado, as diferentes linhagens *lager* (*S. pastorianus*) se diferem por serem resultado de hibridização interespecie de *S. cerevisiae* e *S. eubayanus* (Salazar *et al.*, 2019), portanto precedidas pelas linhagens *ale*. A hibridização espontânea entre essas duas espécies é uma das principais teorias quanto à ancestralidade dessa espécie desde a descoberta da *S. eubayanus* (Libkind *et al.*, 2011), e é fortalecida após a identificação de evidências que defendem que os grupos distintos de *S. pastorianus*, Saaz e Froberg – distinção referente à subdivisão geneticamente distinta de linhagens *lager* usadas na indústria cervejeira moderna (Smart, 2017) – são originados de um mesmo evento de hibridização, possuindo um mesmo ancestral comum (Salazar *et al.*, 2019).

### 2.1.2 Leveduras não-convencionais

Apesar da nítida domesticação de leveduras desde períodos pré-históricos, essa não é a explicação definitiva responsável pela especialização de leveduras para o que temos hoje na indústria cervejeira. É colocada em discussão a divergência neutra, que não contrasta necessariamente com a seleção artificial por nicho (domesticação), e sim adiciona informações importantes como a seleção natural por isolamento geográfico e a dispersão limitada (Goddard & Greig, 2015; Warringer *et al.*, 2011). A partir disso, não só *S. cerevisiae* ou *S. pastorianus* estariam hábeis como potenciais agentes de fermentação de cervejas; afinal, outras espécies podem ter sofrido seleção natural compatível com o processo cervejeiro – degradação de fonte rica em amido, tolerância e produção de álcool, capacidade de floculação, altas taxas de crescimento em propagação, por exemplo. Essa é uma ideia básica que impulsiona a bioprospecção e importante ao falar sobre leveduras não-convencionais na indústria cervejeira.

Bioprospectar esses microrganismos, com potencial cervejeiro, é uma prática intensificada nos anos recentes, visto que o mercado vem apresentando crescimento significativo nas duas últimas décadas (Callejo *et al.*, 2020). Com uma

grande variedade de tipos de cerveja, desde cervejas com baixa caloria/concentração de álcool a cervejas fermentadas de maneira espontânea ou com agentes fermentadores (leveduras) extras para potencialização de compostos ativos de impacto sensorial (Sannino *et al.*, 2019).

O perfil desses organismos geralmente apresenta baixas atenuações e baixas tolerâncias ao etanol; entretanto, eles são capazes de destacar características organolépticas, como textura e impacto, nos aromas constituintes do *bouquet* do produto final (Sannino *et al.*, 2019); o que se aplica, por exemplo, a várias espécies não-*Saccharomyces* capazes de produzir maiores concentrações de aromas do que *Saccharomyces* (Gamero *et al.*, 2016). Por isso, um dos fatores determinantes para seleção desses organismos é quanto ao perfil de componentes ativos, que tem impacto sensorial aromático no produto final (Canonico *et al.*, 2020; Holt *et al.*, 2019; Michel, 2017; Sannino *et al.*, 2019; Steensels *et al.*, 2015).

A variedade de leveduras investigadas pela academia e pela indústria só tem aumentado, direcionando atenção para gêneros antes não associados à fermentação de cervejas, como *Pichia*, *Saccharomycodes*, *Zygosaccharomyces*, *Scheffersomyces*, *Hanseniaspora*, *Torulaspora* e *Cyberlindnera* (Sannino *et al.*, 2019).

Um ponto de grande relevância para investigação e aplicação dessas leveduras não-convencionais é quanto à origem delas. Gamero *et al.* (2016) e Michel (2017) separam as formas de prospecção desses microrganismos em quatro principais vias: (i) uso da biodiversidade natural, (ii) seleção artificial, (iii) evolução direcionada ou (iv) modificação genética. O uso da biodiversidade natural, no contexto de bioprospecção para a indústria cervejeira, – base para a produção desse trabalho – consiste na investigação de cepas que possam ter se adaptado a ambientes onde a capacidade de fermentar o mosto cervejeiro coincide com a utilização da sua fonte natural de carbono (Gamero *et al.*, 2016). Dessa forma, leveduras obtidas a partir de fontes ricas em carboidratos similares aos presentes no mosto cervejeiro – como frutos, tubérculos, raízes e grãos –, e até mesmo microrganismos usualmente considerados “contaminantes”, encontrados durante o processo cervejeiro, são candidatas a triagem para o processo cervejeiro (Michel, 2017).

A seleção artificial consiste no uso de técnicas de indução humana a fim de provocar mudanças no genoma do indivíduo, mais geral que a modificação genética.

Nesse caso, a prospecção de leveduras cervejeiras poderia ser feita a partir de mutagênese, hibridização sexual, hibridização assexual ou por engenharia evolutiva, para que se obtivessem novos fenótipos e que, os de interesse pudessem ser selecionados, como melhor estabilidade genotípica – instabilidade genotípica pode causar perda de habilidades fermentativas importantes em gerações (Pérez-Través *et al.*, 2012) -, mais rápidas absorções de carboidratos, uso otimizado de nutrientes, etc (Mertens *et al.*, 2015; e Skala; Kotylak, 1984 e Winston, 2008).

Já a evolução direcionada, também descrita como adaptativa ou evolução experimental (Butler *et al.*, 1996), consiste na submissão de uma população de leveduras, com métodos de adaptação, a ambientes que proporcionem o aparecimento ou a expressão de propriedades desejadas como, por exemplo, a assimilação de um carboidrato específico ou a tolerância a algum composto de interesse; as mutações espontâneas diante desse determinado ambiente levam, em gerações, a diferentes desempenhos, que podem ser avaliadas e selecionadas para o uso na indústria (Butler *et al.*, 1996 e Elena; Lenski, 2003).

Por último, a prospecção por modificação genética envolve o uso de técnicas para a manipulação do material genético usando, por exemplo, técnicas de edição de DNA, seja para a otimização do genoma de uma cepa em específico ou para a edição com o material genético de outros indivíduos a fim de se alcançar fenótipos como maiores atenuações, resistências, e produção de compostos ativos, entre outros (Michel (2017).

Após definição do método pelo qual a levedura será prospectada, restam os aspectos que podem selecionar ou não cepas quanto aos potenciais de aplicação na indústria e o tipo de aplicação em que essas podem ser submetidas. Quanto aos aspectos de triagem, alguns se destacam, como veremos a seguir nesse trabalho, como a utilização de carboidratos presentes no mosto cervejeiro e também a tolerância alcoólica dessas leveduras, uma vez que o etanol é tóxico às células e letal em determinadas concentrações (Michel, 2017).

Já em termos de possibilidades de aplicação dessas leveduras não-convencionais na indústria, as opções se concentram basicamente em serem usadas como agente de uma fermentação completa, com atenuação de 70-85% de mostos cervejeiros com densidade padrão, expressa em 12 graus Plato (°P), ou de densidades maiores (13-22 °P), tal qual leveduras convencionais (Annemüller *et al.*, 2008; Michel, 2017, Stewart *et al.*, 2013 e Walker & Stewart 2016). Há também a

possibilidade da aplicação com o objetivo de alcançar cervejas sem ou com pouca produção de álcool, como é o exemplo do uso recente da *Saccharomyces ludwigii* (Romano *et al.*, 1999 e De Francesco *et al.*, 2015); ou ainda, a possibilidade do uso como agente de potencialização dos compostos ativos a partir de pré-fermentações (fermentação antes da fermentação principal pela levedura convencional), fermentações mistas (quando as leveduras não-convencionais são inoculadas junto às convencionais), ou em pós-fermentações (fermentações após a fermentação principal, podendo se estender ao processo de maturação) - esse último, um exemplo de como são usadas cepas de *Brettanomyces bruxellensis* em diversos estilos, principalmente belgas (Vanderhaegen *et al.*, 2003).

### 2.1.3 Cinética de fermentação

Um fator importante em fermentação é a cinética do processo, ou seja, a velocidade com que as reações de biotransformação ocorrem. A fermentação de cervejas ocorre, geralmente, em condições de batelada, apesar de existirem outros modelos de fermentação (Pham *et al.*, 2010). A fermentação em batelada consiste em um sistema fechado onde há a suplementação inicial e limitante de nutrientes. É nesse sistema que as leveduras devem se multiplicar, em propagação, principalmente na fase *log* do crescimento, onde podemos calcular a taxa específica máxima de crescimento,  $\mu_{\max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) (Stanbury, 2017).

Quando se trata do controle de qualidade de produção de leveduras, vários parâmetros são levados em consideração, como estabilidade de armazenamento, resistência a condições de temperatura etc. Mais especificamente para leveduras cervejeiras, a capacidade de fermentação é um parâmetro essencial. Dentro da eficiência de fermentação visando o produto final, o  $\mu_{\max}$  é um fator chave, uma vez que tem relação direta com a taxa de biomassa do sistema, ou seja, a velocidade de formação de biomassa, sendo uma variável importante para otimização do processo de fermentação, ou seja, quanto maior for a taxa específica máxima de crescimento, menor o tempo do processo (Van Hoek *et al.*, 1998 e Sampaio *et al.*, 2017).

### 2.1.4 Tolerância Alcoólica

Primordialmente, o objetivo da fermentação cervejeira é a conversão dos carboidratos fermentescíveis do extrato complexo (mosto) em etanol e a produção de compostos voláteis com impacto sensorial (Smart, 2017). O etanol, entretanto, apesar de produzido pelas leveduras, é tóxico a esses microrganismos e pode exercer papel deteriorante durante e pós-fermentação. A síntese desse álcool é realizada dentro da célula e sua excreção se dá por difusão pela membrana celular. A síntese, que atinge seu ápice durante a fermentação em si – no metabolismo anaeróbico – e que pode significar uma alta concentração no citosol, devido a uma maior taxa de produção do que de difusão desse composto químico (D'Amore *et al.*, 1988).

Dentre os efeitos danosos do etanol às células de leveduras, apresentados na TABELA 1, baseada em Smart (2017), destaca-se a sua característica mutagênica, sobretudo no DNA mitocondrial. O dano causado pode se tornar permanente e se perpetuar em gerações seguintes, no caso de reutilização de leveduras em processos sequenciais de fermentação (Smart, 2017).

TABELA 1 – EFEITOS DANOSOS DO ETANOL EM LEVEDURAS.

Efeitos	Referência
Inibição do crescimento e redução do tamanho de células	Canetta <i>et al.</i> , 2006
Redução da viabilidade celular, especialmente por efeito mutagênico no metabolismo respiratório	Cheung <i>et al.</i> , 2012
Redução da respiração e da assimilação de glucose	Pascual <i>et al.</i> , 1988
Redução da fermentação	Fernandes <i>et al.</i> , 1997
Inativação enzimática, modificações lipídicas e perda de força próton motriz na membrana celular	Mizoguchi & Hara, 1997 e Petrov; Okorokov, 1990
Aumento da permeabilidade da membrana celular	Marza <i>et al.</i> , 2002
Diminuição do pH citoplasmático e indução de mutantes respiro-deficientes.	Chi & Arneborg, 1999; Ibeas & Jimenez, 1997 e Jiménez <i>et al.</i> , 1988

FONTE: Adaptado de Smart (2017).

A tolerância ao etanol é um fator de ampla variedade entre espécies de leveduras, relacionado à grande variedade de conformações e composições de

membranas – principal sítio de dano pelo álcool – e também à quantidade de etanol que poderá ser produzido até o final do processo fermentativo (Michel, 2017). Diante disso, se torna imprescindível a utilização de leveduras com tolerâncias adequadas aos métodos de produção, em fermentações primárias e principalmente sequenciais/secundárias – requeridas após a fermentação principal ou durante a maturação, a fim de atingir características sensoriais diferentes e/ou mais evidentes (Holt *et al.*, 2018)(Michel, 2017 e Smart, 2017). A média de concentração de etanol em cervejas produzidas a partir de mostos de 12 °P é de 5% v/v (D'Amore *et al.*, 1988).

É importante destacar, entretanto, que o grande foco da literatura acerca dos efeitos danosos e limitantes do etanol, até tempos recentes, esteve diante de cepas de *S. cerevisiae*. Isso pode indicar uma ampla possibilidade de prospecção de novas espécies com propriedades de membrana que podem variar significativamente – principalmente por conta da divergência evolutiva – de cepas de *S. cerevisiae*. Da mesma forma é sabido que cepas de espécies de fermentação *lager* possuem respostas diferentes a estresse ambiental, sobretudo no que diz respeito a temperaturas (Smart, 2017).

#### 2.1.5 Floculação

A floculação é um fenômeno de agregação celular não-sexual em que células formam aglomerados a partir de estruturas de superfície das paredes celulares, chamadas floculinas (lectinas). Há uma relação direta entre sua proporção na superfície celular e a habilidade de floculação da cepa. A habilidade de floculação é chave para o processo de produção na indústria de bebidas: uma baixa floculação pode ter influência negativa no processo de *downstream*, uma vez que a floculação acelera o processo de decantação, e, por isso também, na possibilidade de uma segunda fermentação, dificultada pela presença excessiva de células em suspensão provenientes da primeira biotransformação. Por outro lado, uma habilidade excessiva nessa interação pode contribuir para uma floculação prematura, prejudicando o processo de fermentação e levando à reabsorção insuficiente de dicetonas vicinais, como o diacetil (Boulton, 2017).

Esse processo deve ser entendido, principalmente, como um processo de adaptação ao estresse, uma vez que a formação desses aglomerados contribui para

a manutenção e a sobrevivência dos indivíduos, sobretudo na parte interna dos flocos. Os fatores que influenciam a floculação são variados e compreendem desde aspectos físico-químicos, como agitação mecânica, pH, temperatura, hidrofobicidade, oxigênio e/ou etanol, a fatores genéticos (Powell et al., 2003 e Verstrepen *et al.*, 2003). Destacaremos aqui os parâmetros mais bem explorados na literatura, relacionados à disponibilidade de açúcar, influência do cálcio e a fatores genéticos.

A disponibilidade de açúcar no meio é um ponto fundamental para o início do processo de floculação. Enquanto a disponibilidade é alta, as células se dispersam no meio, assegurando o acesso e o consumo eficiente da fonte de carbono, principalmente por meio da ligação de açúcares, como glucose e maltose, às lectinas. Por outro lado, na escassez de açúcares fermentescíveis no ambiente, as leveduras se aglomeram a fim de otimizar seu metabolismo, pelas vantagens para sobrevivência que essa forma de organização possibilita (Boulton, 2017). Como por exemplo, quando células dentro da aglomeração morrem e entram em autólise, podem servir como fonte de nutrientes para as outras (Jin; Speers, 2000) ou a proteção ao estresse do meio às células no interior do agregado celular (Rose, 1984 e Rossouw et al., 2015).

Quanto ao íon de cálcio  $\text{Ca}^{2+}$ , ele é fator limitante da floculação, uma vez que o processo é cálcio-dependente. As estruturas de lectina só se conectam a outras estruturas celulares como mananas e/ou glucanas, formando as ligações para agregação, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (Stewart, 2018). Por isso, vários cátions, como  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$ , são capazes de inibir a floculação por competirem com os íons de cálcio pelos pontos de ligação. O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), com sua função quelante, é agente comum de métodos para desflocular leveduras a fim de medir níveis de floculação, em oposição à saturação de  $\text{Ca}^{2+}$  para obter o efeito contrário (D'Hautcourt; Smart, 1999).

Já em relação a fatores genéticos, a floculação parece estar mais diretamente ligada à presença dos genes FLO, relacionados principalmente à produção e à regulação de floculinas, incluindo o fenótipo *NewFLO*, diferente pela interação das floculinas com um número maior de açúcares, e os genes do fenótipo MI (insensível a manose), relacionados a ligações proteína-proteína entre células, como resumido na TABELA 2, baseada em Stewart (2018) e Bester et al. (2006).



TABELA 2 – GENES RELACIONADOS À FLOCULAÇÃO

Genes	Característica	Carboidratos que inibem a floculação
FLO1, FLO5, FLO9 e FLO10	Produção de floculinas	Apenas manose
FLO8	Regulação de genes FLO	Não conhecido
Lg-FLO1	Fenótipo <i>NewFLO</i>	Manose, glucose, sacarose, maltose e maltotriose
FLO11	Formação em cadeia, pseudohifa	Sem inibição por açúcares
FLONL e FLNS	Fenótipo similar a <i>NewFLO</i>	Manose, glucose, sacarose, maltose, maltotriose e galactose
Não conhecidos e raros	Insensível a manose (MI) e floculação independente de cálcio	Sem inibição por açúcares

FONTE: Adaptado de Bester *et al.* (2006), Boulton (2017) e Stewart (2018).

## 2.2 BIOQUÍMICA CERVEJEIRA

### 2.2.1 Composição do mosto Cervejeiro

O principal processo na produção de cerveja é a biotransformação dos açúcares fermentescíveis contidos no mosto, principalmente, em etanol e dióxido de carbono. Sendo a atenuação aparente, parâmetro que descreve a conversão desses açúcares em etanol (Evans; Hamet, 2005) –. O mosto é composto a partir dos produtos solúveis dos cereais maltados utilizados e dos demais ingredientes cervejeiros, como lúpulo e adjuntos (Wolfgang, 2019). O mosto cervejeiro, se comparado com outros meios de fermentação de álcool, como de vinhos e cidras, por exemplo, é muito mais complexo, contemplando uma grande diversidade de açúcares, aminoácidos, peptídeos, proteínas, vitaminas, íons, ácidos nucleicos, entre outras moléculas (Stewart, 2017).

No que diz respeito aos carboidratos presentes no mosto, estes são solubilizados e hidrolisados por enzimas produzidas durante a germinação dos grãos. Esses grãos contribuem com amido – 70 a 85% de sua composição – que, em grande parte, sofrerá degradação catalisada pelas enzimas  $\alpha$ - e  $\beta$ -amilases. Desse modo é gerado principalmente maltose, seguido de uma proporção menor de maltotriose e glucose, além de dextrinas remanescentes (Vidgren, 2010; Wolfgang,

2004). O perfil e a proporção de carboidratos presentes no mosto são apresentados na TABELA 3 baseada em Stewart (2009).

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO.

<b>Carboidrato</b>	<b>% na composição</b>
Glucose	10 – 15
Frutose	1 – 2
Sacarose	1 – 2
Maltose	50 – 60
Maltotriose	15 – 20
Dextrinas	20 – 30

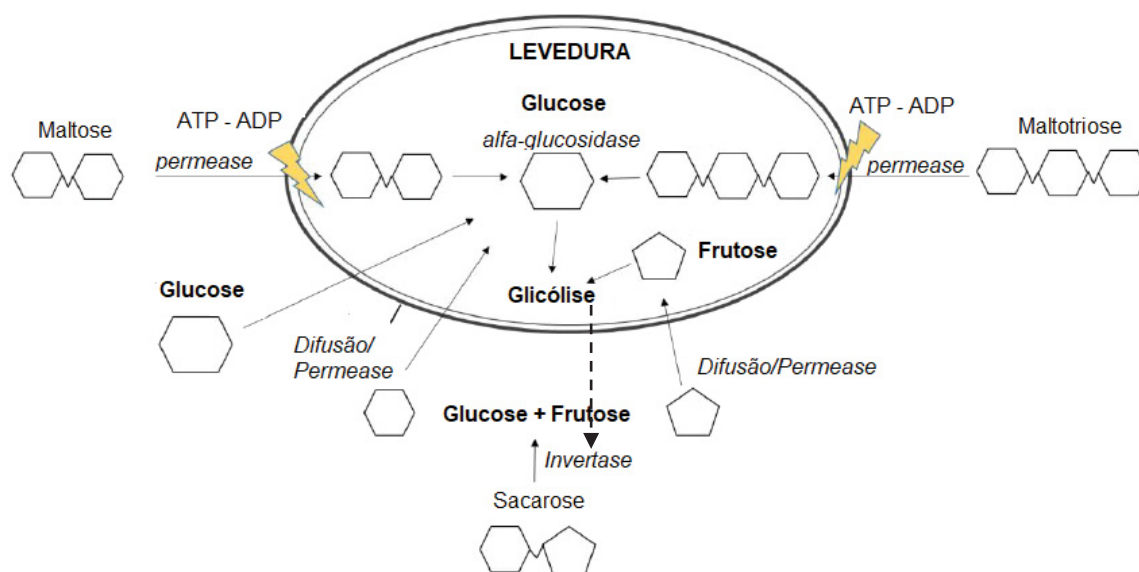
FONTE: Adaptado de Stewart (2009).

### 2.2.2 Glucose

Apesar de ser apenas o terceiro sacarídeo mais abundante no mosto cervejeiro, normalmente, leveduras consomem, em ordem de prioridade, glucose, frutose, sacarose – com sobreposições entre esses três primeiros -, maltose e maltotriose (Stewart, 2009). O fato da glucose ser a fonte de carboidrato preferencial de leveduras faz com que esse monossacarídeo seja um fator limitante para a assimilação dos demais oligossacarídeos presentes, já que o consumo dele será priorizado (Stewart, 2009 e Vidgren, 2010).

Um ponto chave para a capacidade de assimilação da glucose, ou qualquer outro mono- ou oligossacarídeo, está em como essas moléculas são transportadas para dentro das células, mais especificamente, como esse transporte é feito através da membrana plasmática. Os monossacarídeos glucose e frutose tem sua assimilação mediada nas células de leveduras pela família de transportadores das hexose permeases (HXT), que facilitam a difusão desses monossacarídeos (FIGURA 1), não requerendo energia para o transporte (difusão facilitada) (Vidgren, 2010).

FIGURA 1 – ASSIMILAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS DO MOSTO EM LEVEDURA



FONTE: Modificado a partir de Michel, 2017.

Diante da facilidade de assimilação de glucose pelas leveduras em relação à assimilação de maltose, por exemplo, uma concentração alta de glucose poderia atrasar significativamente o processo de fermentação. É necessário lembrar, entretanto, que o processo de produção de cerveja possui dois estágios de metabolismo energético, que estão diretamente relacionados com as condições de oxigênio e disponibilidade de fontes de carbono, a respiração e fermentação.

As duas vias energéticas podem ocorrer separadamente (*Crabtree* negativo) ou simultaneamente (*Crabtree* positivo) a depender da capacidade da levedura. Em leveduras *Crabtree* negativas, a fase *log* do crescimento microbiano é caracterizado principalmente pela multiplicação celular, usando como via energética principal a respiração aeróbia, que consome principalmente oxigênio, usualmente proveniente da oxigenação artificial do mosto, e glucose do sistema. Nessa fase de multiplicação celular intensa, temos a fase aeróbica do processo, até que, se alcance o consumo total do oxigênio e se altere a via energética para a fermentação em si. É então na fase anaeróbica, fase estacionária do crescimento celular, que os carboidratos fermentescíveis são biotransformados em etanol e dióxido de carbono (Ata et al., 2018).

Já leveduras com fenótipo *Crabtree* positivo, como *Saccharomyces cerevisiae*, a fase *log* do crescimento apresenta característica respiro-fermentativa, onde a via de fermentação é alcançada, simultaneamente com a respiração celular,

ainda durante a fase log do crescimento celular (Ata *et al.*, 2018 e Wolfgang, 2019), produzindo uma quantidade de biomassa menor que as *Crabtree* negativas, entretanto com fermentação alcoólica adiantada (Dashko *et al.*, 2014).

O processo de crescimento intenso da fase log, em ambos fenótipos de metabolismo energético citados anteriormente, pode equilibrar o consumo, onde a assimilação de maltose não seja limitada, uma vez que a assimilação de glucose será priorizada. Porém, ainda assim, o uso de adjuntos que aumentam a proporção de glucose – usados comumente para diminuir os custos - pode levar ao atraso da assimilação de maltose e, por consequência, o prolongamento do processo de fermentação (Boulton, 2017).

### 2.2.3 Maltose e Maltotriose

A maltose, resultado da ligação de duas moléculas de glucose por uma ligação glicosídica  $\alpha$ -(1,4), é obtida a partir da degradação do amido (Ouellette, R. J. & Rawn, 2018), assim como a maltotriose, um oligossacarídeo formado por três moléculas de glucose em ligação glicosídica  $\alpha$ -(1,4'). O consumo de maltose, como citado anteriormente, é limitado na presença de glucose no meio fermentativo, iniciando sua assimilação pela célula quando aproximadamente 60% da glucose já fora utilizada (D'Amore *et al.*, 1989).

Todavia, a maltose é o carboidrato mais abundante no mosto cervejeiro (Stewart, 2009), portanto a assimilação desse dissacarídeo é essencial para a eficiência da conversão do extrato.

Os loci MAL são um dos principais conjuntos de genes relacionados com a assimilação da maltose, compreendendo três genes importantes: MALx1 e MALx2, responsáveis pela codificação de transportador e enzima hidrolítica, respectivamente, e MALx3, que produz promotor para a transcrição dos dois primeiros genes (Boulton, 2017 e Charron *et al.*, 1989). É também um ponto referencial de como as leveduras cervejeiras se adaptaram à domesticação; leveduras ale, apresentam alterações genótípicas como um forte incremento no número de genes MAL, resultado de múltiplas cópias de cromossomos (Gallone *et al.*, 2016 e 2017; e Gonçalves *et al.*, 2016).

De um ponto de vista bioenergético, os transportadores de maltose e maltotriose tem por característica o consumo de energia (ATP) para a assimilação

desses oligossacarídeos (Michel, 2017), o que não é o caso para glucose, como já mencionado antes (item 2.2.2 e Figura 1). Esse é um dos motivos pelo qual a eficiência dos transportadores desses oligossacarídeos é um fator tão relevante, afinal a baixa eficiência de transportadores pode significar baixa assimilação de maltose e maltotriose.

Essa eficiência é um fator comercial importante, uma vez que a composição do mosto cervejeiro conta com a maltotriose como o segundo carboidrato mais abundante (Boulton, 2017). Entretanto, enquanto a capacidade de assimilação de maltose é um dos principais requisitos para uma levedura cervejeira, a habilidade de utilização de maltotriose aparece como muito variada, de severas dificuldades até o uso eficiente, entre espécies (Dietvorst et al., 2005).

Assimilação de maltotriose é um dos principais fatores desejáveis a se observar quando é realizada a prospecção de leveduras para fins na indústria cervejeira. Porém, é uma característica difícil de encontrar na natureza. Entre os principais resultados de mutações que prejudicam a fermentação de mosto cervejeiro – como deficiência respiratória e troca entre fenótipo floculento e não-floculento – está justamente a perda de habilidade de assimilação de maltotriose (Stewart, 2009). Uma explicação para esse fenômeno está no fato de que maltose e maltotriose compartilham entre si várias proteínas de transporte, mas que são mais eficientes para maltose. Assim, a limitação de transportadores e a baixa eficiência são um fator chave na assimilação de maltotriose (Han *et al.*, 1995).

Em resumo, um fenótipo importante para fermentação do mosto cervejeiro seria a habilidade de fermentar completamente a maltose e uma certa habilidade de fermentar maltotriose, contribuindo não só com uma conversão mais eficiente do extrato em etanol, mas também agindo diretamente em fatores de impacto sensorial, como o dulçor e perfil de voláteis a serem formados (Sampaio et al., 2017). Os impactos do consumo de maltose na produção de compostos voláteis é percebido, porém ainda não completamente claros; uma possibilidade levantada é que o metabolismo de maltose, em diferentes níveis, pode produzir diferentes níveis de acetil-CoA, resultando em impactos na produção de ésteres (He *et al.*, 2014).

#### 2.2.4 Melibiose

A melibiose é um dissacarídeo formado pela ligação  $\alpha$ -(1-6) das moléculas de D-galactose e D-glucose. No passado, a assimilação de melibiose era um fator chave para taxonomia de leveduras cervejeiras, classificadas em melibiase-negativas para leveduras da espécie *S. cerevisiae*, por tanto, leveduras do tipo *ale*; e melibiase-positivas para leveduras do *S. pastorianus*, ou do tipo *lager* (Sampaio *et al.*, 2017).

Os métodos utilizados para fazer distinções entre leveduras *ale* e *lager* a partir da assimilação de melibiose partem da habilidade de leveduras da espécie *S. pastorianus* (*lager*) de produzir a enzima extracelular  $\alpha$ -galactosidase – chamada também de melibiase e codificada pelo gene MEL1 -, enquanto que leveduras de espécie *S. cerevisiae* (*ale*) não possuem essa habilidade (Gallone *et al.*, 2017). Esses métodos fenotípicos de distinção entre *ale* e *lager* têm grande importância e abrangência na indústria cervejeira. No entanto, a rigor, têm sido questionados quanto a serem ou não suficientes para determinar essa distinção (Gallone *et al.*, 2017).

Apesar de serem métodos que respondem bem para as espécies citadas, uma vez que as leveduras *ale* e *lager* são do gênero *Saccharomyces* (Nakao *et al.*, 2009) não é claro se abrangem outras espécies que já são, ou possam vir a ser, utilizadas para o processo de produção de cervejas. Além disso, um estudo do sequenciamento de 157 cepas de *S. cerevisiae*, incluindo 102 cepas de indústria cervejeira, 12 cepas de vinho, 7 de saquê, entre outras, demonstrou que pelo menos 10 das cepas utilizadas na indústria cervejeira eram para produção de cervejas *lager*, perfil até então relacionado a leveduras da espécie *S. pastorianus* (Gallone *et al.*, 2016). Essas incertezas, somadas a estratégias de otimização da indústria, como grandes fermentadores cilindro-cônicos que induzem leveduras *ale* a sedimentação, minam a distinção a partir de um só método fenotípico de uma classificação que abrange várias características (Deak, 2007; Gallone *et al.*, 2017)

Diante disso, além da avaliação da assimilação de melibiose, e mesmo para diferenciação de linhagens dentro da espécie *S. pastorianus*, são recomendados outros meios para identificar características de cada cepa, como o perfil de floculação e o padrão de consumo de carboidratos (Powell & Kerruish, 2017).

### 2.2.5 Produção de Etanol

O etanol é o principal produto de vários processos industriais fermentativos, sobretudo de bebidas fermentadas. A exploração de microrganismos para a produção desse composto data das civilizações mais antigas, mesmo sem a ciência sobre eles. A produção era dirigida pelos benefícios que já se constatavam, como aumento de tempo de validade, auxílio na digestão e efeito euforizante (Alba-lois *et al.*, 2010). Apesar da produção ser realizada há milênios, as rotas bioquímicas para a obtenção do etanol por leveduras só foram elucidadas no século XX (Bennetzen & Hall, 1982 e Schmitt *et al.*, 1983).

Após a fase respiratória ou respiro-fermentativa, considerando o efeito *Crabtree*, no ambiente já sem oxigênio (anaeróbio), a glicólise converte os açúcares fermentescíveis em piruvato, que por sua vez entra em uma rota exclusivamente fermentativa. A partir desse ponto, o piruvato é convertido em acetaldeído em uma reação catalisada pela enzima piruvato descarboxilase, para que seja então convertido em etanol pela ação da enzima álcool desidrogenase (ADH). Essa última enzima é essencial para o processo, não apenas para a catalisação da conversão em etanol em si, mas por ser limitante e/ou potencializadora desse processo, uma vez que é codificada por sete genes em *S. cerevisiae*, em múltiplas cópias, e representa um papel fundamental no potencial de atenuação de uma cepa (Dzialo *et al.*, 2017 e Sampaio *et al.*, 2017).

Das principais enzimas relacionadas à produção de etanol, três se destacam. A primeira, produzida a partir do gene *Adh1*, é responsável pela conversão em etanol e formação de  $\text{NAD}^+$ . *Adh2* é um gene de manutenção ativo na ausência de glucose e responsável pela oxidação de etanol como fonte de carbono. *Adh3* é ativo tanto na produção quanto na utilização de etanol, porém é expresso em mitocôndria, com função principal de manter o balanço redox (Bakker *et al.*, 2001, Leskovac *et al.*, 2002 e De Smidt *et al.*, 2012).

Contraditoriamente, quando se trata da produção de etanol, o desenvolvimento de tecnologias objetiva desde alcançar-se maiores concentrações possíveis de etanol até obter produtos com a menor concentração possível dele. Por exemplo, o uso de fontes elétricas, por meio de eletrodos, ao cultivo de *S. cerevisiae* para alcançar maior e mais rápida produção de etanol (Mathew *et al.*, 2015), e a fermentação de bebidas com concentração reduzida do composto, (sem álcool ou



com pouco álcool) resultado de demanda de mercado, seja por questões de saúde ou econômicas — em muitos países, impostos de consumo incidem sobre produtos baseando-se na concentração de álcool (Dzialo *et al.*, 2017).

#### 2.2.6 Metabólitos secundários da fermentação

Além da fermentação alcoólica, a produção de compostos ativos de impacto sensorial é uma das características que se destacam para seleção de novas leveduras para a produção de cervejas. É importante diferenciar compostos voláteis de compostos ativos com impacto no sabor do produto final (soma entre percepções de gosto, textura e aroma), mais especificamente no aroma (Tournier *et al.*, 2007). Em cervejas, os compostos voláteis somam mais de 800; já os compostos ativos somam apenas algumas dezenas mas, encontrados em determinadas concentrações, podem apontar qualidade e/ou identidade de um produto (Sannino *et al.*, 2019). Na TABELA 4 são exemplificados alguns desses compostos e seus respectivos descritores e limiares de percepção organoléptica.

TABELA 4 – COMPOSTOS ATIVOS E LIMIAR ORGANOLÉPTICO.

Compostos Ativos	Descritor	Limiar organoléptico (mg/L)
<i>Álcoois superiores</i>		
n-propanol	Aroma alcoólico	800
Isobutanol	Aroma alcoólico	200
Álcool Isoamílico	Banana e frutado	70
2-Fenil etanol	Rosas e dulçor	125
<i>Ésteres</i>		
Acetato de Etila	Solvente, frutado e dulçor	30
Acetato de Isoamila	Banana, maçã, solvente e frutas amarelas	1,2
<i>Compostos Carbonílicos</i>		
Acetaldeído	Folhas verdes, frutado, maçã-verde	25
Diacetil	Manteiga	0,15

FONTE: Adaptado de FlavorActiv; (2020); Olaniran *et al.* (2017); e Sannino *et al.* (2019).

Os compostos ativos podem atuar de forma positiva ou negativa no produto final a depender de sua concentração e/ou do estilo de cerveja desejado. Além disso, a percepção desses compostos não está apenas ligada às suas características individuais, mas também a fatores do meio em que estão presentes, como pH, temperatura, concentração de etanol, concentração e variedade de sais, proteínas, etc, que formam um efeito matriz; ou seja, esses compostos passam por interações de sinergia ou antagonismo que vão resultar no perfil organoléptico final (Holt *et al.*, 2018; Lytra *et al.*, 2013 e San-Juan *et al.*, 2011). Por conta disso, algumas faixas de concentrações desejadas, como de álcoois superiores, estão abaixo do limiar de detecção sensorial (*threshold*), ou seja, nessas concentrações (<300 mg/L) tem papel importante nas interações, mas ao serem percebidas isoladamente ou em concentrações muito altas, podem trazer características indesejáveis (Olaniran *et al.*, 2017). Essas concentrações desejáveis ou não, porém, devem ser avaliados de acordo com o perfil final esperado, o que por vezes pode inviabilizar a avaliação baseada nesse único aspecto (Brewers Association, 2020). Exemplo disso são cepas do gênero *Brettanomyces* ssp., que, apesar de produzirem compostos ativos em geral indesejáveis, descritos como “suor de cavalo”, “couro” e “plástico queimado”, são aplicadas a estilos de cerveja com objetivos sensoriais diferenciados e bem aceitos no mercado (Holt *et al.*, 2018).

#### 2.2.6.1 Álcoois superiores

Um dos tipos de metabólitos secundários resultantes do processo de fermentação são os álcoois superiores, diretamente relacionados ao metabolismo de aminoácidos nas leveduras. Esses componentes podem ter impactos positivos ou negativos em bebidas fermentadas a depender de sua concentração (TABELA 4) e interação com os demais compostos ativos, a exemplo da influência no *drinkability* do álcool isoamílico, tornando o sabor mais “pesado” (Dzialo *et al.*, (2017 e Olaniran *et al.*, (2017). Além dos impactos na indústria de bebidas, esses compostos também têm aplicações no combate a pragas na agricultura, por atrair insetos e possibilitar sua eliminação, e até mesmo como antifúngicos, por suas propriedades de inibir a germinação de fungos filamentosos (Ando *et al.*, 2012; Hua *et al.*, 2014).

A via metabólica que melhor caracteriza a formação desses compostos ativos é a elucidada primeiramente por Ehrlich (1907), que dá nome à via, e é

composta por três processos: transaminação, descarboxilação e redução (Dzialo *et al.*, 2017).

A primeira etapa da via de Ehrlich ocorre após a assimilação dos aminoácidos presentes no meio, que são convertidos em  $\alpha$ -cetoácidos em reações catalisadas por transaminases. Dentre as principais enzimas catalisadoras nesse processo, Bat1 e Bat2 são responsáveis pela transaminação de amino ácidos de cadeia ramificada, enquanto Aro8 e Aro9 agem em aminoácidos aromáticos, fenilalanina e triptofano, respectivamente (Kispal *et al.*, 1996). A segunda etapa consiste na descarboxilação dos  $\alpha$ -cetoácidos em aldeídos, catalisada por piruvato descarboxilases (Pdc1, Pdc5 e Pdc6) ou pela enzima fenilpiruvato descarboxilase (Aro10) (Dzialo *et al.*, 2017 e Vuralhan *et al.*, 2003). A terceira e última etapa consiste na redução dos “aldeídos superiores” em reações catalisadas principalmente por ADHs, como as citadas anteriormente no metabolismo do etanol, Adh1 e Adh2 (Dzialo *et al.*, 2017).

#### 2.2.6.2 Ésteres

Os ésteres podem ser encontrados em quantidades significativas em cervejas por serem produtos do metabolismo de leveduras, sobretudo durante a fermentação alcoólica (Campo *et al.*, 2007). Eles representam um dos mais importantes grupos de compostos ativos com impacto nas características organolépticas de bebidas fermentadas (TABELA 4), com descritivos geralmente relacionados a aromas florais ou que lembram frutas (Brányik *et al.*, 2008, Nordström, 1966 e Verstrepen; Derdelinckx, Guy; *et al.*, 2003). A concentração desses componentes no produto final é um ponto chave para avaliar os efeitos positivos, geralmente associados a concentrações moderadas e com sinergia com outros compostos presentes mesmo abaixo do limiar de percepção organoléptico, ou negativos de sua presença, em geral relacionados a altas concentrações (Gee & Ramirez, 1994, Olaniran *et al.*, 2017 e Rodrigues *et al.*, 2008).

As reações metabólicas potencialmente envolvidas no processo de formação desse grupo de compostos envolvem álcool e acetil-CoA ou acil-CoA, produzindo ésteres acetatos ou etil-ésteres, respectivamente. Os ésteres acetatos são os mais influentes na composição do *bouquet* aromático, devido à natureza lipofílica e de tamanho desses compostos em relação aos etil-ésteres. Essas reações são

catalisadas por álcool O-acetiltransferases (AATs), sendo as enzimas de *S. cerevisiae* Atf1 e Atf2, responsáveis pela produção de ésteres acetatos e Eeb1 e Eht1, na conversão a etil-ésteres (Cherry *et al.*, 2012).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CEPAS

##### 3.1.1 Isolamento a partir de Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) foi coletada, em colaboração com a empresa Bio4-Soluções Biotecnológicas®, de bioma Amazônico no município de Castanhal - PA, Brasil, de acordo com as coordenadas geográficas 1°05'25.4"S 47°50'46.2"W, a partir de diferentes etapas do processo de produção de Tucupi – um líquido amarelado extraído da Mandioca (FIGURA 2) - e ingrediente usado em diversos pratos da região norte do Brasil (Campos *et al.*, 2017) –, sendo os produtos destas etapas: cascas, cortes e massa úmida macerada, os quais foram armazenados em sacos plásticos assépticos. O processo de isolamento iniciou-se a partir da submersão das matrizes (0,1 g/ml) em mosto estéril *Bavarian Pilsner Liquid Malt Extract* (Weyermann® *Special Malts*, 2019), 12°P, acrescido de ampicilina (50 µg/ml), por 72 h e temperatura de 25 °C. Na sequência, foi aplicada a técnica de diluição fatorial decimal, seguida de inoculação de 100 µL em placas contendo meio YPD-ágar 2%, espalhamento com alça estéril, e incubação de 48 h a 25 °C, até visível identificação de colônias a partir de sua morfologia.

FIGURA 2 – PROCESSO DE PRODUÇÃO DO TUCUPI A PARTIR DE MANDIOCA



FONTE: O Autor (2018).

LEGENDA: Processo de lavagem dos tubérculos durante a produção do tucupi.

### 3.1.2 Registro das cepas

As demais cepas de leveduras investigadas nesse trabalho (TABELA 5), assim como as isoladas em cooperação, foram cedidas pela empresa Bio4-Soluções Biotecnológicas® a partir de convênio assinado entre as partes (Universidade e empresa) publicado no Diário Oficial da União, em novembro de 2018 (Brasil, 2018), para a sua utilização com finalidade de pesquisa e desenvolvimento tecnológico, atendendo o previsto na lei nº 13.123/2015 (20 de maio de 2015 da Presidência de Republica) e seus regulamentos de acesso ao Patrimônio Genético, por meio do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen); com número de cadastro A07F3A1 e A2990B1, a partir das matrizes indicadas abaixo:

TABELA 5 – CEPAS PREVIAMENTE ISOLADAS INVESTIGADAS NO PRESENTE TRABALHO

Designação	Origem
PA09 <sup>1</sup>	Fermentação do jambuaçu
PA10 <sup>1</sup>	Fermentação do jambuaçu
COCOAR <sup>1</sup>	Fermentação do cacau
MARA1 <sup>1</sup>	Fermentação do maracujá
PM01 <sup>1</sup>	Fermentação da Cana-de-açúcar
SY001	Comercial
SY004	Comercial
SY025	Comercial

Cadastro SisGen A07F3A1<sup>1</sup> e A2990B1<sup>2</sup>.

FONTE: O Autor (2019).

### 3.1.3 Ativação e manutenção

As cepas foram recuperadas do armazenamento em meio YPD + glicerol (10% m/v) a -80 °C, e reativadas em meio YPD, em período de crescimento em meio líquido, sob agitação em frascos, por 3-5 dias, a 30 °C. A manutenção das cepas foi realizada em meio sólido YPD, ágar 2% (m/v) armazenado a 4°C.

### 3.1.4 Cepas Controle

As cepas comerciais SY001 (*Pilsner Lager*), SY004 (*German Lager*) e SY025 (*American Ale*) foram utilizadas como controles nos ensaios.

## 3.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS

### 3.2.1 Extração de DNA

Cerca de 1 cm<sup>2</sup> de colônias, com 48 h de crescimento, foram transferidas para microtubos com sílica:celite (2:1) contendo 300 µL de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), maceradas com bastão de vidro e, em seguida, foram adicionados mais 200 µL de CTAB; os microtubos foram aquecidos em “banho-maria” a 65°C por 10 min.



Após o aquecimento, foi adicionada uma mistura de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA, 500 µL, 24:1) em cada microtubo, que foi centrifugado a 16.000 g por 7 min e o sobrenadante transferido para um novo microtubo; esta etapa foi repetida mais uma vez.

Ao sobrenadante resultante da etapa anterior, foram adicionados 800 µL de etanol 96% gelado, e o material foi mantido durante uma noite a -20 °C. Em seguida, uma centrifugação a 16.000 g por 7 min foi realizada, e o sobrenadante descartado; ao precipitado foi adicionado o volume 500 µL de etanol 70% gelado. Após nova centrifugação, a 16.000 g por 7 min, todo o sobrenadante foi descartado.

O precipitado desta centrifugação foi desidratado e o DNA ressuspensionado em 100 µL de água ultrapura esterilizada. O microtubo com DNA foi mantido a temperatura ambiente por 24 h para completa hidratação. Após esse período, a quantificação realizada em espectrofotômetro NanoDrop™2000/2000c e a confirmação da qualidade do DNA em gel de agarose 1%.

### 3.2.2 Identificação por alinhamento filogenético

A identificação realizada a partir do sequenciamento parcial do material genético isolado, comparando a região do espaçador transcrito interno (ITS), utilizado por ser uma região não codificante e com alta variação, permitindo diferenciação dos indivíduos eucariotos como leveduras (Hall *et al.*, 2010) e da região D1/D2 do gene codificador da subunidade maior do ribossomo (LSU). Os fragmentos do ITS 1 e 2 e do gene 5, 8.S foram amplificados por PCR com os *primers*, LS266 (5'-GCATTCCCAAACAACACTCGACTC-3') e V9G (5'-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3') e a região D1/D2 foi amplificada utilizando os *primers* NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3').

As amplificações das duas regiões foram realizadas em um volume total de 12,5 µL, contendo 1× Tampão de PCR, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 31 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada *primer*, 0,03 U/mL de BioTaq DNA Polimerase e 20 ng de DNA genômico, sendo utilizadas as seguintes condições: 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 35 s, 52°C por 30 s e 72°C por 1 min, após os ciclos, novamente 72°C por 7 min. A temperatura de anelamento foi alterada para 48°C para a amplificação da região D1/D2 de alguns isolados. Após a purificação, foi procedido o



sequenciamento utilizando os mesmos pares de *primers*, nas seguintes condições: 96°C por 2 min, 96°C por 10 s, 52°C por 10 s, 62°C por 4 min, com 35 ciclos. O sequenciamento foi realizado em sequenciador ABI 3730 (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram editadas utilizando o BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5 e foram alinhadas, inspecionadas visualmente e realizada a reconstrução filogenética utilizando o *software* MEGA 7.0.26. As sequências utilizadas para construção das árvores filogenéticas foram selecionadas do banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information).

### 3.3 CALIBRAÇÃO DE ABSORBÂNCIA E CONCENTRAÇÃO CELULAR

A partir da identificação dos gêneros das leveduras em estudo, foram construídas curvas de calibração entre densidade óptica, observada em espectrofotômetro *SpectraMax® Plus 384* em comprimento de onda ( $\lambda$ ) 600 nm ( $DO_{600}$ ), e concentração de células viáveis, a partir de teste de viabilidade celular utilizando azul-de-metileno em triplicata. Deste modo, foi possível aproximar a concentração celular relativa a cada  $DO_{600}$ , levando em consideração o gênero de cada cepa (Mueller, 2015), fazendo com que o número de células nos ensaios, fossem aproximados ao máximo entre as linhagens.

### 3.4 ASSIMILAÇÃO DE MALTOSE

A capacidade das cepas de utilizarem maltose como única fonte de carbono foi analisada em placas contendo o meio mínimo *Yeast Nitrogen Based* (YNB), Sigma-Aldrich®, acrescido de ágar 2% (m/v), maltose 2% (m/v) e ampicilina (50  $\mu$ g/mL) (Santa María, 1964). A inoculação foi realizada em gotas no volume de 5  $\mu$ L, sem espalhamento, em concentração celular de aproximadamente  $10^7$  células/mL (lavadas três vezes em solução salina 0,85% estéril, por centrifugação a 2500 rpm por 5 min), no meio sólido citado anteriormente, com incubação por 48 h a 25 °C.

Os resultados foram processados a partir da observação do crescimento de colônias a olho nu.

### 3.5 COMPARAÇÃO DA TAXA ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO

Baseado em Olivares-Marin *et al.* (2018), com modificações, foi avaliada a taxa específica máxima de crescimento das linhagens a partir da inoculação de  $\sim 10^7$  células/mL em 150  $\mu$ L de meio YPD líquido (Briggs *et al.*, 2004), em microplaca de 96 poços com tampa. A microplaca foi incubada em leitor de microplaca *SpectraMax® Plus 384 Microplate Reader* a 25°C, sob agitação padrão do equipamento pré-leitura, por 48 h. A medição da DO<sub>600</sub> realizada em intervalos de 30 min, em triplicata e certificado com brancos, também em triplicata.

Os dados obtidos a partir do ensaio de crescimento em meio líquido foram utilizados para obtenção de curvas de crescimento construídas e analisadas a partir dos pacotes *growthrates* e *growthcurver*, utilizando *software* livre, RStudio, de linguagem R. Os códigos modificados estão disponíveis em anexo (ANEXO 2), de acordo com o desenvolvido por Hall *et al.* (2014) e Petzoldt (2017).

### 3.6 TOLERÂNCIA ALCOÓLICA

Baseando-se em protocolos de Michel (2017) e Olivares-Marin *et al.* (2018), as cepas foram submetidas a crescimento em condições de estresse alcoólico, pela presença de etanol, a fim de demonstrar suas respectivas respostas de tolerância alcoólica por meio do crescimento.

O método seguiu as mesmas condições do ensaio de comparação de taxa específica máxima de crescimento, exceto pela composição do meio de crescimento. As cepas foram inoculadas em meio YPD líquido, adicionado de etanol a 5 ou 10% (v/v). A diferença entre a concentração inicial de células e a concentração final, após o período de 48 h, foi medida a partir da absorbância, com o instrumento *SpectraMax® Plus 384 Microplate Reader* (DO<sub>600</sub>), em triplicata. O crescimento, indicando a tolerância, foi detectado a partir do aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da concentração celular em relação ao branco.

### 3.7 ASSIMILAÇÃO DE MELIBIOSE

A demonstração de assimilação de melibiose seguiu o protocolo descrito em White e Zainasheff (2010). O processo de inoculação, em placa com meio sólido de Extrato de levedura (1% m/v), peptona (2% m/v) e galactose (2% m/v), utilizou-se de 5  $\mu$ L (em gota) de suspensão de cada cepa em concentração de  $\sim 10^7$  células/ml

(lavadas em centrifugação em solução salina 0,85% estéril), incubado a 30 °C e na ausência de luz, por 5–7 dias. A assimilação positiva é demonstrada, de maneira qualitativa, a partir da presença de coloração azul nas colônias, pela degradação do substrato X- $\alpha$ -GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\alpha$ -D-galactosídeo), visíveis a olho nu.

### 3.8 ENSAIO DE FLOCULAÇÃO

Foram utilizadas para análise massas celulares recuperadas a partir de culturas de leveduras com período de crescimento de 72 h em YPD, a 25°C e 120 rpm e a partir de centrifugação 2500 rpm (1350 x g) (Bendiak et al.,1994; D'Hautcourt; Smart, 1999).

As suspensões de células foram lavadas por centrifugação com solução de EDTA (0,5 M, pH 7.0), e diluídas em solução salina 0,85% estéril até uma concentração celular de aproximadamente  $10^6$  células/mL, a partir das curvas de calibração construídas, no volume final de 10 mL. A floculação então mensurada de acordo com método de *Helm*, com modificações de Bendiak et al. (1994) e D'Hautcourt; Smart (1999).

As suspensões de células foram submetidas a dois tratamentos separadamente, denominados A e B, em triplicata em cada um deles. O tratamento “A” corresponde a centrifugação, descarte do sobrenadante e suspensão do precipitado em 9,9 mL de solução salina e 0,1 mL de EDTA 0,5 M. As suspensões foram então homogeneizadas e 1 mL foi transferido para cubeta de leitura para diluição com 9 mL de água para leitura da DO<sub>600</sub>. Água estéril foi utilizada como branco.

O tratamento “B” corresponde a centrifugação, descarte do sobrenadante e primeira lavagem do precipitado em solução de CaCl<sub>2</sub> (0,2 mM), para saturação de Ca<sup>2+</sup>, seguido de lavagem em solução de CaCl<sub>2</sub> (0,2 mM), 4,05 g/L de ácido acético glacial e 6,8 g de acetato de sódio, em pH 4,5, mantendo o volume de 10 mL. Com a homogeneização da solução e repouso por exatos 7 min, 1 mL foi retirado e diluído em 9 mL de água estéril, em 600 nm e de forma aleatória.

A porcentagem de floculação foi medida a partir da fórmula abaixo, onde A e B, são as médias de absorbâncias relacionadas aos tratamentos A e B, respectivamente.

$$\frac{100 * (A - B)}{A}$$

Com os dados obtidos, as atividades de floculação foram comparadas com os grupos levantados por Verstrepen; Derdelinckx, G.; et al. (2003). Esses grupos, a partir de método de Helm, relacionam porcentagens de floculação de 90 a 100% à característica fenotípica de extrema floculação, de 40 a 90% à característica comum de leveduras industriais e de 0 a 15%, relacionadas às leveduras não-floculentas.

### 3.9 PROPAGAÇÃO

A propagação celular das cepas foi avaliada em dois ciclos de escala laboratorial (1:10), de acordo com Quain (2017) e Michel (2017). Os isolados em investigação foram recuperados na forma de colônias isoladas de placas de YPD-ágar, inoculados, em triplicata, em tubos de ensaio com 10 mL de mosto estéril a 12,5 °P, e incubados por 24 h, de modo estático a 25 °C. Após, o conteúdo de propagação foi transferido para frascos de *Erlenmeyer* de 250 ml com volume de 100 mL de mosto estéril a 12,5°P. Os recipientes foram incubados por 72 h, em agitação orbital de 90 rpm a 25°C. A vitalidade e viabilidade celular foram então mensuradas através da visualização de células totais e viáveis, a partir de microscópio óptico e utilização de azul-de-metileno, método pelo qual se avalia a viabilidade a partir da degradação do substrato pelas leveduras viáveis (sem coloração) e mortas (com coloração azul).

### 3.10 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE CARBOIDRATOS POR HPLC-RID

Para avaliar o perfil de consumo dos carboidratos mono-, di- e trissacarídicos do mosto pelas leveduras sob estudo, foi utilizado um método baseado nas condições de fermentação descritas por Holt *et al.* (2018), Michel (2017) e Quain (2017), e nas condições de HPLC-RID empregadas por Jurková *et al.* (2018), com as especificações cromatográficas resumidas na Tabela 6.

TABELA 6 –CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS PARA DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS POR HPLC-RID

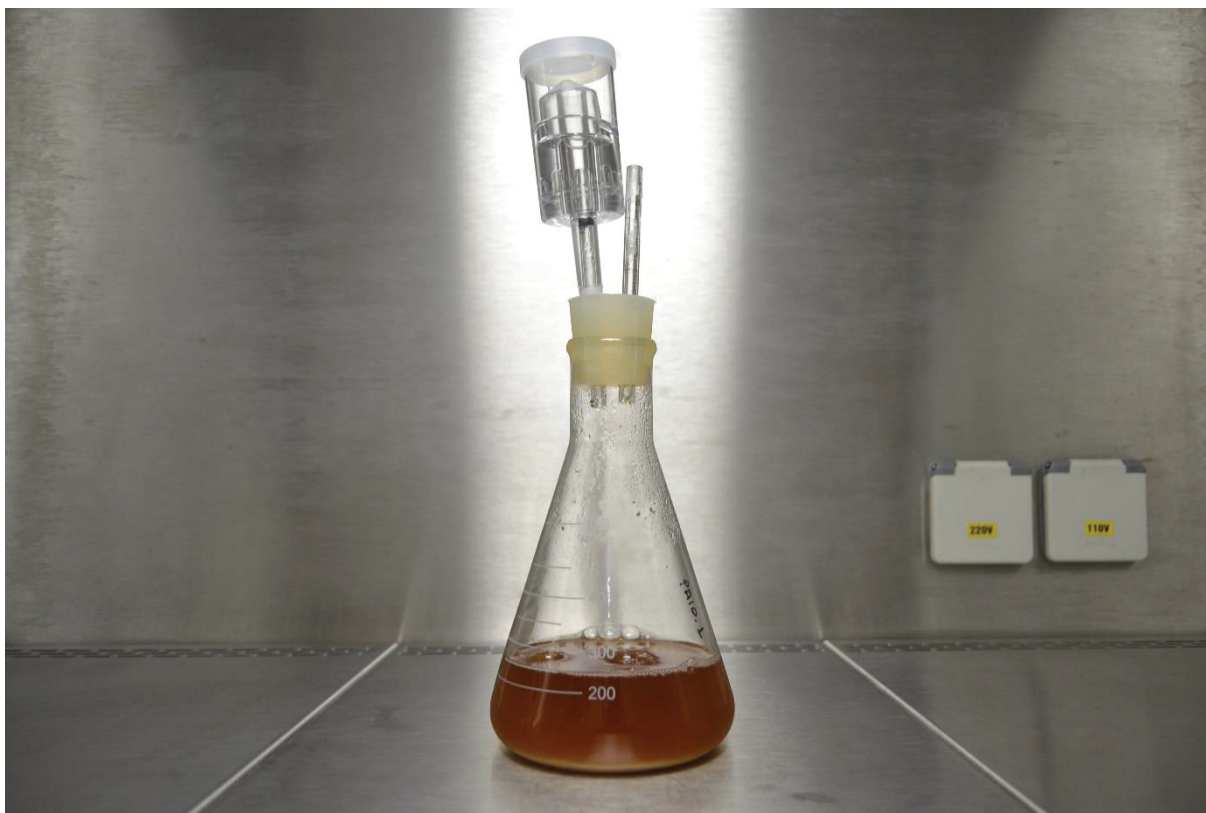
<b>Especificações</b>	
Coluna	Rezex RSO-Oligosaccharide, 200 x 10 mm
Fase móvel	Água ultrapura
Fluxo	0,3 mL/min
Detector	Índice de refração (RID)
Temperatura do forno	80°C
Temperatura do detector	40°C
Injeção	20 µL
Tempo de corrida	60 min

FONTE: O autor (2020).

As fermentações foram realizadas em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL no volume final de 200 mL (meio + inóculo), com o uso de *airlocks* com solução sanitizante - etanol 70% (v/v) -, empregando uma concentração inicial de  $12,5 \times 10^6$  células viáveis/mL inoculadas em mosto estéril (Weyermann® *Special Malts*, 2019), a 12,5 °P (Quain, 2017), em incubação estática, a 22°C, por período de 7-8 dias, de acordo com a não identificação de perda de massa dentro da margem de erro do equipamento de medida (1 mg) em 48 ; modelo como capturado na FIGURA 3.

As amostras foram submetidas a filtragem em filtro hidrofílico de poro 0,2 µm (*PureTech®Syringe Filter*) e diluídas em água ultrapura. A detecção dos carboidratos presentes foi realizada pela comparação com o tempo de retenção dos padrões (maltotriose, maltose e glucose) em cromatógrafo *HPLC Agilent-1200 series* (*Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA*) (Tabela 6). Para a quantificação foi utilizada a calibração externa, a partir de curvas padrão com carboidratos de referência: [0,4 – 0,00125 mg/mL] para glucose, [0,4 – 0,00781 mg/mL] para maltose e [0,4 – 0,03125 mg/mL] para maltotriose.

FIGURA 3 – FRASCO COM *AIRLOCK* UTILIZADO PARA FERMENTAÇÃO EM LABORATÓRIO



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Planta laboratorial para fermentação.

### 3.11 ATENUAÇÃO APARENTE E ESTIMATIVA DE TEOR ALCOÓLICO

A determinação de atenuação aparente e a estimativa de teor alcoólico após a fermentação do mosto foram realizadas baseadas nas medidas de densidade, em triplicata, do mosto não-fermentado e das amostras após fermentação, utilizando o equipamento densímetro digital DMA 4500, Anton Paar®.

Os cálculos para determinação do grau de atenuação aparente (*ADA*, %) e porcentagem de álcool por volume (*ABV*, % (v/v)) foram realizados a partir das equações (1) e (2), respectivamente (Thesseling et al.,2019):

$$ADA = 1 - \frac{ER}{EO} * 100 \quad (1)$$

onde:

ER = extrato residual, em °P

EO = extrato original, em °P

$$ABV = (GO - GF) * 131,25 \quad (2)$$

Onde, gravidade específica descreve a razão entre a densidade do mosto e a densidade de água pura, na mesma temperatura (Thesseling *et al.*, 2019) :

GO = Gravidade específica original

GF = Gravidade específica final

### 3.12 DETERMINAÇÃO DOS SUBPRODUTOS DE FERMENTAÇÃO POR GC-FID

Para a detecção e a quantificação de metabólitos secundários, foi realizada uma mistura das três (3) observações de fermentação obtidas no ensaio anterior, transformando-as em uma só solução homogênea, permitindo uma análise quantitativa dos subprodutos de fermentação de cada cepa em estudo. Realizou-se a retirada de células (em centrifugação a 2500 rpm, por 10 min), e então, as amostras foram congeladas a -20 °C até a análise por cromatografia gasosa.

As amostras recuperadas foram acrescidas de padrão interno (25 µL de n-butanol), para a quantificação de acetaldeído, acetato de etila, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico, e submetidas à destilação, recuperando-se 50% do volume original. A análise foi realizada em cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização de chama (GC-FID) *Perkin Elmer Clarus 580* e coluna *Elite WAX Polyethylene glycol*, seguindo as configurações presentes na Tabela 7 e baseado em protocolo descrito por EBC (1987).

**TABELA 7 – CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS NA QUANTIFICAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE FERMENTAÇÃO POR GC-FID**

<b>Especificações</b>	
Coluna	60 m 0,25 mm Elite-WAX Polyethylene glycol, 0,25 µm
Injeção	<i>Autosampler</i> , 1 µL
Temperatura do Injetor	220°C
Detector	Ionização de chama (FID)
Temperatura do detector	250 °C
Temperatura do forno	40 °C; (5 °C/min), 70 °C, isoterma (7,4 min); (25 °C/min), 90 °C; isoterma (5,80 min)
Gás de arraste	N <sub>2</sub>
Vazão de arraste	2 mL/min

FONTE: O Autor (2020).

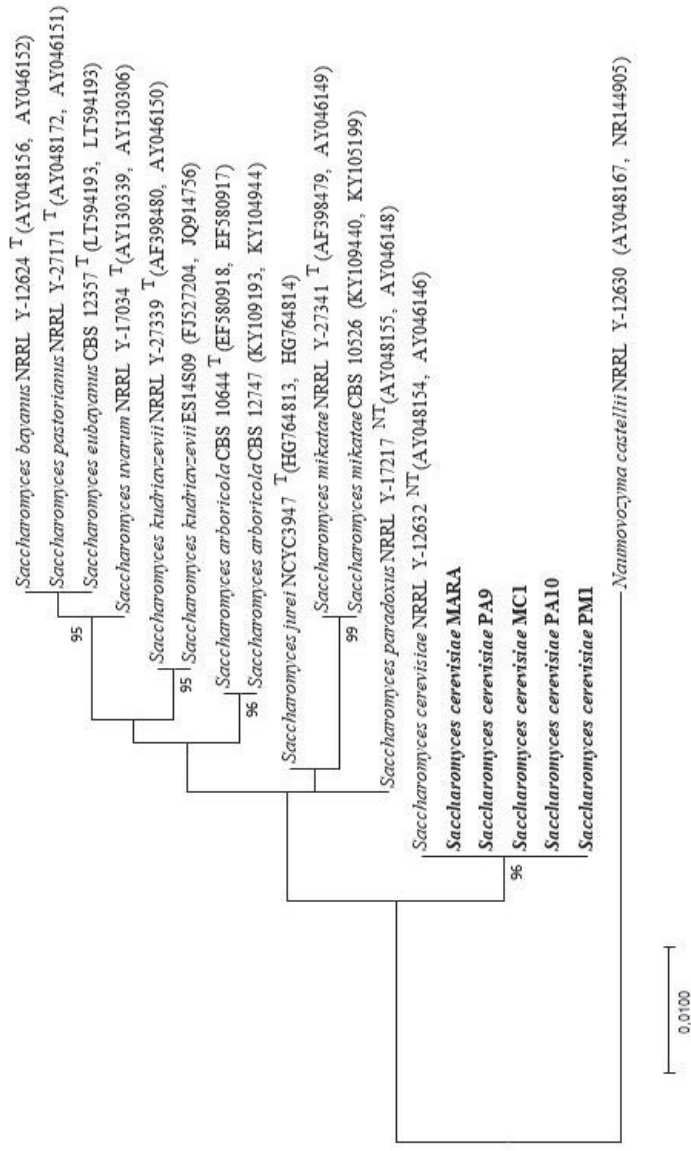
## **4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS**

### **4.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS**

Com o sequenciamento da região ITS, foi possível a construção de árvores filogenéticas (GRÁFICOS 1 e 2), utilizando-se como referência espécies presentes no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information).



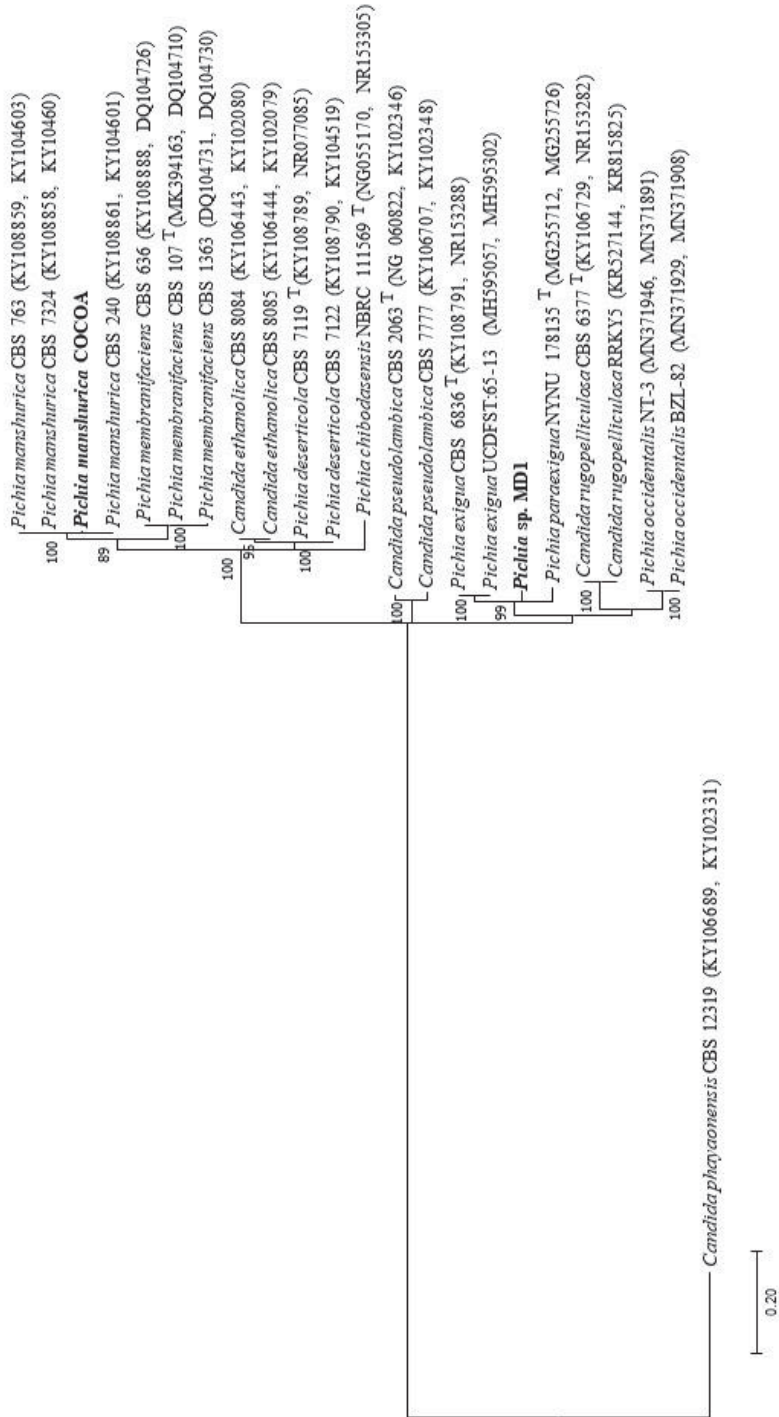
GRÁFICO 1 – Árvore filogenética multilocus (Parte I) incluindo as cepas do presente trabalho.



FONTE: O Autor.

LEGENDA: Filogenia de isolados de *Saccharomyces cerevisiae* e espécies proximalmente relacionadas baseada em análise multilocus (LSU D1/D2 e ITS). A árvore foi construída usando o método de Máxima Verossimilhança implementada no MEGA 7.0.26 usando o modelo Kimura-2 parâmetros com distribuição gama (K2+G). Valores de *bootstrap* acima de 95 a partir de 1000 replicatas estão mostrados nos ramos. As espécies identificadas nesse estudo estão indicadas em **negrito**. T indica *type strain*. NT, indica *neotype strain*. Os códigos de acesso às linhagens no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) estão indicados entre parênteses. *N. castellii* foi usada como *outgroup*.

GRÁFICO 2 – Árvore filogenética a partir do ITS (Parte II)



FONTE: O Autor.

LEGENDA: Filogenia de isolados do gênero *Pichia* e espécies proximalmente relacionadas baseada em análise multilocus (LSU D1/D2 e ITS). A árvore foi construída usando o método de Máxima Verossimilhança implementada no MEGA 7.0.26 usando o modelo Kimura-2 parâmetros com distribuição gama e sítios invariáveis (K2+G+I). Valores de *bootstrap* acima de 80 a partir de 1000 replicatas estão mostrados nos ramos. As espécies identificadas nesse estudo

estão indicadas em negrito. T indica *type strain*. Os códigos de acesso às linhagens no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) estão indicados entre parênteses. *Candida phayaonensis* foi usada como *outgroup*

A análise partiu de triagem preliminar entre gêneros de leveduras. Ao constatar os alinhamentos das cepas investigadas com os gêneros *Saccharomyces* e *Pichia*, foram realizadas análises para determinar verossimilhança entres *clusters* dentro desses gêneros.

A partir da análise da árvore filogenética para *Saccharomyces*, a verossimilhança com *bootstrap* de 96 de 1000 replicas (ocorrência de pareamento entre sequências em 96% das 1000 observações realizadas aleatoriamente) entre as sequências das cepas investigadas, **PA09**, **PA10**, **Mara1** e **PM01**, e da linhagem referência *S. cerevisiae* NRRL Y-12632 (NCBI:txid1330326), sugere que pertencem todas à mesma espécie.

Já a partir da análise da árvore filogenética para *Pichia*, a linhagem **Cocoa R** apresentou verossimilhança com *bootstrap* de 100 em 1000 réplicas (100%) entre referências da espécie *Pichia manshurica*, sugerindo o pertencimento a mesma espécie. A cepa **MD1** apresentou um *bootstrap* de 99 em 1000 réplicas (99%) com duas espécies de referência, *P. exigua* e *P. paraexigua*, sem a separação dos ramos entres essas espécies. Diante disso, a partir da análise multilocus realizada, é inconclusivo a determinação da espécie dessa linhagem.

A partir do processo de extração e amplificação do DNA, foi possível constatar ainda que a cepa **MC2** não se enquadrava em características de levedura, já que não foi possível a ampliação da região ITS. Há a chance de que, na realidade, a cepa MC2 não esteja dentro do reino *Fungi* – grupo de abrangência de identificação da região ITS (Schoch et al., 2012) –, levantando a suspeita de se tratar de algum procarioto, como uma bactéria resistente a ampicilina. Diante disso, a cepa MC2 foi excluída do grupo de investigação desse trabalho.

Com os resultados das análises de identificação processados, as leveduras investigadas e utilizadas, a partir desse ponto, nesse trabalho são as descritas na Tabela 5.

TABELA 8 – CONJUNTO DE CEPAS IDENTIFICADAS

Designação	Espécie	Origem
PA09 <sup>1</sup>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fermentação do jambuaçu
PA10 <sup>1</sup>	<i>S. cerevisiae</i>	Fermentação do jambuaçu
COCOAR <sup>1</sup>	<i>Pichia manshurica</i>	Fermentação do cacau
MARA1 <sup>1</sup>	<i>S. cerevisiae</i>	Fermentação do maracujá
PM01 <sup>1</sup>	<i>S. cerevisiae</i>	Fermentação da Cana-de-açúcar
MC1 <sup>2</sup>	<i>S. cerevisiae</i>	Fermentação da massa cevada de mandioca
MD1 <sup>2</sup>	<i>Pichia spp.</i>	Fermentação de pedaços de mandioca
SY001	<i>S. pastorianus</i>	Comercial
SY004	<i>S. pastorianus</i>	Comercial
SY025	<i>S. cerevisiae</i>	Comercial

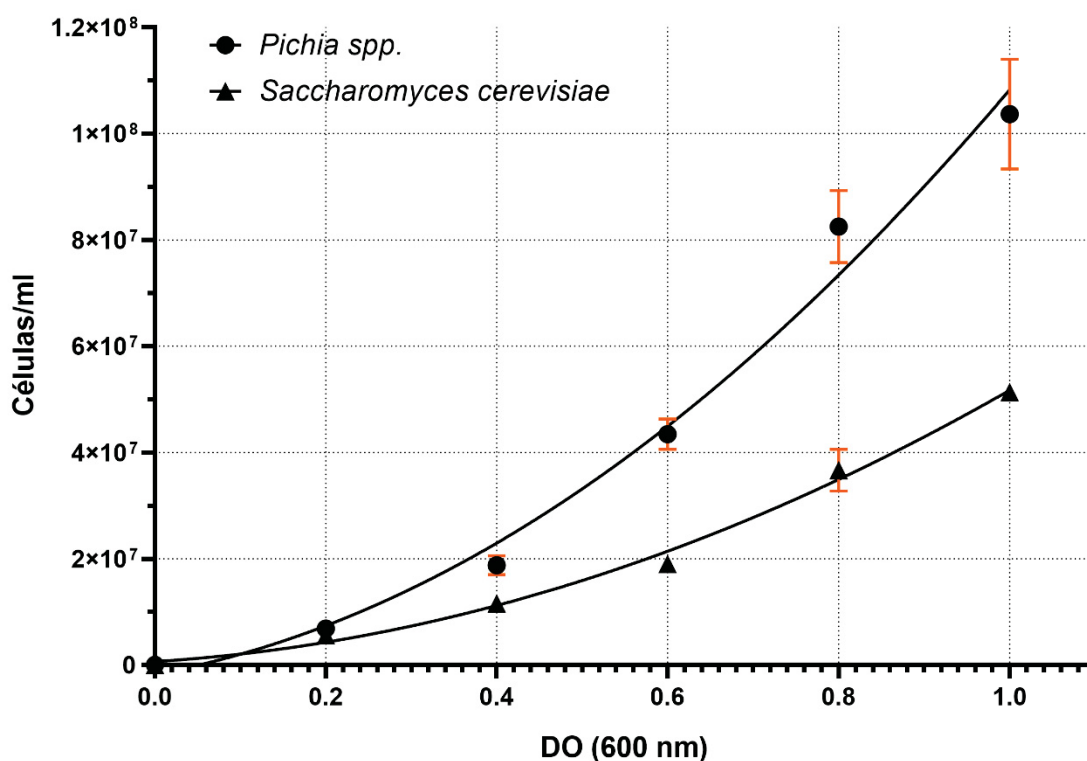
Cadastro SisGen A07F3A1<sup>1</sup> e A2990B1<sup>2</sup>.

FONTE: O autor (2019).

#### 4.2 CURVAS DE CALIBRAÇÃO DE DENSIDADE ÓPTICA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

As curvas de calibração, ilustradas no GRÁFICO 3, entre absorbância em 600 nm e concentração celular foram construídas após a identificação das cepas em investigação. Foram escolhidas duas cepas, representando, cada uma, um modelo para seu gênero de levedura, uma vez que foram identificados dois gêneros principais a partir do ITS; como modelo de *Pichia spp.* foi usada a cepa COCOAR e para *Saccharomyces spp.* a levedura comercial SY025, *S. cerevisiae*.

GRÁFICO 3 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DE DENSIDADE ÓPTICA (DO) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR (CÉLULAS/ML).



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Medidas da média de concentração celular e a densidade óptica obtidas, acompanhado do desvio padrão da média, usando regressão polinomial quadrática.  $R^2$  de 0,98 para curva de *Pichia spp.*; e  $R^2$  de 0,99 para *S. cerevisiae*.

As curvas de calibração foram melhor descritas por funções polinomiais de segunda ordem, como esperado em observações avaliadas por métodos de turbidimetria a partir de microcultivos (Held, 2010; Jung *et al.*, 2015; Stevenson *et al.*, 2016).

Ao estabelecer a turbidez de suspensões de células de leveduras, consideramos que o tamanho e opacidade celular sejam constantes, é possível verificar relações diferentes entre as absorvâncias em 600 nm e as concentrações celulares das duas cepas (Zakhartsev; Reuss, 2018). Para fazer a distinção e calibrar, com menos incerteza, a concentração de células relacionada à absorvância nos ensaios seguintes, assumimos que, apesar de o tamanho das células de leveduras poder variar bastante, a depender de fatores nutricionais e ambientais (Ahmad *et al.* (2008), o tamanho das leveduras do mesmo gênero, portanto mais

próximas filogeneticamente, deve permanecer similar entre si (Mueller, 2015 e Zadrag-Tecza *et al.*, 2018).

#### 4.3 ISOLADOS A PARTIR DA MANDIOCA

O isolamento se deu de forma a favorecer o crescimento de leveduras que fossem capazes de fermentar matriz rica em amido, como é característica da mandioca (Campos *et al.*, 2017), e selecionar os microrganismos que pudessem se adequar ao ambiente de fermentação. É sabido que propriedades do meio fermentativo, como pH ácido e alta concentração de dióxido de carbono, são características que beneficiam o domínio ecológico de leveduras desejáveis e a assepsia do processo, agindo como barreira de crescimento de bactérias patogênicas (Liu, 2015), para além do antibiótico utilizado.

A partir desse método de seleção, foram isoladas 3 cepas de microrganismos, distintas morfológicamente, a partir de duas fontes de mandioca: cortes (MD1 e MD2) e massa úmida macerada (MC1). Não foi possível a manutenção de cepas obtidas a partir das cascas de mandioca usadas. Outras cepas foram obtidas durante o mesmo processo de isolamento; porém, seja por conta de questões nutricionais específicas, simbioses ou dinâmica celular (Ali *et al.*, 2018 e Jackson, 2014), não foi possível a manutenção delas em laboratório.

A partir desse resultado, as cepas isoladas passaram por identificação molecular, triagem e na sequência caracterização quanto a perfis relacionados à indústria cervejeira.

#### 4.4 ASSIMILAÇÃO DE MALTOSE

Para que se possa demonstrar a assimilação de maltose como fonte de carbono, é necessário usar um meio que tenha este dissacarídeo como fonte única de carbono (Santa María, 1964). O meio *Yeast Nitrogen Base* é um meio mínimo adequado para determinar a utilização de fontes de carbono por leveduras (HiMedia Laboratories, 2015); assim, o crescimento celular nesse meio indica a assimilação de maltose.

Todas as cepas de interesse nesse ensaio, apresentaram crescimento em meio mínimo com maltose, como indicado na FIGURA 4. A demonstração de que as

linhagens metabolizam maltose em aerobiose é um resultado desejável, diante da abrangência desse carboidrato no meio fermentativo (Stewart, 2009), e encerra a etapa de triagem relacionada à assimilação de carboidrato, visto que nem todas as leveduras metabolizam esse carboidrato em condições aeróbicas e/ou anaeróbicas (Briggs *et al.*, 2004).



FIGURA 4 – AVALIAÇÃO DE ASSIMILAÇÃO DE MALTOSE EM PLACA



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: Placa com meio líquido YNB, Sigma-Aldrich® com maltose para avaliar as diferentes cepas: (A) SY001; (B) SY004; (C) PA09; (D) PA10; (E) COCOAR; (F) MARA1; (G) MC1; (H) MC2, excluída das análises após ensaio de identificação filogenética; (I) PM01; (J) MD1.

#### 4.5 TAXA ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO ( $\mu_{\text{MAX}}$ )

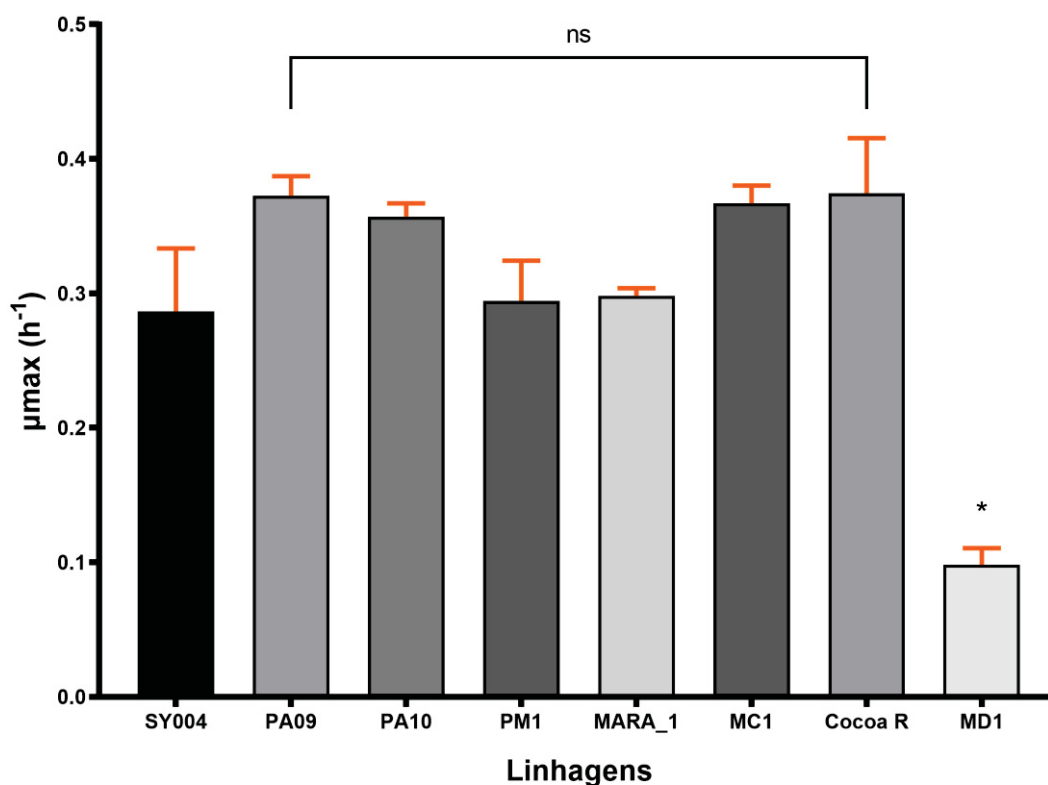
A  $\mu_{\text{max}}$  é um parâmetro chave para processos fermentativos (Van Hoek *et al.*, 1998), sendo utilizado em diversos trabalhos como fator de comparação de eficiência entre leveduras para utilização na indústria cervejeira (Alvarez *et al.*, 2014; Araújo *et al.*, 2018; Gassler *et al.*, 2020; Van Hoek *et al.*, 1998; Sampaio *et al.*, 2017 e Slouka *et al.*, 2017). Calculamos esse parâmetro do crescimento das leveduras em estudo no meio YPD nas condições de escala laboratorial descritas anteriormente. Foram utilizadas as leveduras comerciais disponíveis como referência de comparação, uma vez que as leveduras comerciais já são utilizadas na indústria e



que nossos ensaios não mimetizam condições industriais, impossibilitando o uso de referências industriais (Smart,2017).

Para o processamento adequado das curvas de crescimento (modelos não-lineares submetidos a transformação logarítmica), as configurações padrão no algoritmo foram modificadas: a variável “h”, que está relacionada com o número de pontos da curva de crescimento a serem considerados para determinar a melhor disposição do traçado tangente, foi modificada em cada curva para abranger apenas o período *log*, desconsiderando as fase de aceleração e desaceleração, pré- e pós-fase *log*, respectivamente. Dessa maneira, foi possível adequar os cálculos aos diferentes perfis de curvas encontrados. Entretanto, o valor de quota – referente ao coeficiente de determinação ( $R^2$ ) - não foi modificado, sendo utilizado em 0,95 (ANEXO 2).

GRÁFICO 4 – COMPARAÇÃO ENTRE MÉDIAS DA TAXA ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO ( $\mu_{\text{MAX}}$ ) EM MEIO YPD.



FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: A análise ANOVA comparou as médias de  $\mu_{\text{max}}$  das cepas investigadas com as obtidas pelo controle comercial SY004 (*S. pastorianus*), pelo método de comparações múltiplas de Dunnett ( $\alpha = 0,001$ ), e serviu como base na construção do

gráfico. (\*) Descreve diferença significativa e (ns) descreve diferença não-significativa, em relação ao controle.

A partir da análise estatística por comparações múltiplas de Dunnet, é possível estabelecer diferenças nítidas entre dois grupos de interesse: (1) o grupo com as cepas com médias de  $\mu_{\max}$  próximos ou superiores ao controle SY004 e (2) a cepa MD1 com  $\mu_{\max}$  significativamente abaixo do controle ( $p < 0,0001$ ). Essa última cepa, isolada de mandioca inteira, não tendo  $\mu_{\max}$  similar ou superior à cepa comercial controle foi excluída da triagem.

As cepas PA09, PA10, MC1 e Cocoa R apresentaram  $\mu_{\max}$  sem diferença significativa quando comparadas à linhagem controle, empregando taxa de erro familiar ( $\alpha$ ) de 0,001 (IC 99,9%), e diferença superior empregando  $\alpha = 0,05$  (IC = 95%), de acordo com a análise ANOVA com método Dunnet. Deste modo, assim como as demais cepas dentro do grupo (1) foram consideradas aptas, uma vez que tiveram desempenho melhor ou comparável – dentro das limitações do modelo laboratorial – à linhagem controle já utilizada na indústria cervejeira.

#### 4.6 TOLERÂNCIA ALCOÓLICA

As cepas em estudo foram submetidas a crescimento em estresse alcoólico nas concentrações de etanol 5 e 10% (v/v), para investigação de sua tolerância e de sua habilidade de fermentação sequencial/secundária no processo de produção de cervejas, como realizado por (Michel *et al.*, 2016). A partir da comparação da diferença de turbidez ( $p < 0,05$ ), indicando crescimento significativo, das cepas com o branco (meio sem células) e o controle com a linhagem comercial SY001 (*S. pastorianus*), com tolerância ao etanol de 9% ABV (Bio4, 2020), realizada análise estatística (ANEXO 3.A) para a construção da TABELA 9.

TABELA 9 – CRESCIMENTO EM ESTRESSE ALCOÓLICO

Etanol %(v/v)	Branco	SY001	PA09	PA10	Cocoa R	MARA1	MC1	PM01
5	-	+	+	+	+	+	+	+
10	-	-	+	+	-	-	+	-

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: (+) indicando o crescimento e (-) indicando o não crescimento.

As cepas PA09, PA10 e MC1 apresentaram crescimento em 10% (v/v) etanol, enquanto, para Cocoa R, MARA1 e PM01, a mesma concentração se mostrou letal. Desse modo, é possível realizar fermentações secundárias em cervejas com concentração de etanol em até 10% (v/v) com as cepas PA09, PA10 e MC1, enquanto as cepas Cocoa R, MARA1 e PM01 podem ter habilidade de fermentação secundária em cervejas com concentração de etanol de até 5% (v/v).

#### 4.7 ASSIMILAÇÃO DE MELIBIOSE

A principal resposta que se procura responder com o ensaio de assimilação de melibiose é a diferenciação de leveduras do tipo *ale* e *lager* (Sampaio *et al.*, 2017). Para isso foi realizado o ensaio pelo método X-alfa-GAL, que tem como principal característica conferir coloração azulada em cepas capazes de assimilar melibiose, a fim de investigar a assimilação desse dissacarídeo pelas cepas em estudo (TABELA 10).

TABELA 10 – ASSIMILAÇÃO DE MELIBIOSE EM MEIO SÓLIDO

SY001	SY004	PA09	PA10	Cocoa R	MARA1	PM01	MC1
+	+	-	-	+	-	+	+

FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: (+) indicando a presença de coloração azul e (-) indicando a ausência de coloração azul. Registro fotográfico no ANEXO 1.

Utilizando como controle positivo as linhagens SY001 e SY004, ambas *S. pastorianus* (melibiose-positivas), foi possível atribuir o mesmo fenótipo melibiose-positivo às cepas Cocoa R (*P. manshurica*), PM01 (*S. cerevisiae*) e MC1(*S. cerevisiae*).

Para a cepa Cocoa R, o fenótipo positivo de assimilação de melibiose contrasta, a nível de espécie, com a o trabalho realizado por Tolieng *et al.* (2018), que identificou a não-assimilação de D-melibiose por linhagens da espécie *P. manshurica*. Entretanto, há diferenças quanto a fonte de isolamento das linhagens, onde nesse trabalho a linhagem de *P. manshurica* foi isolada de fruto de cacau, enquanto que as investigadas por Tolieng *et al.* (2018) foram isoladas de diferentes

etapas do processamento de cana-de-açúcar, o que pode indicar uma diferença adaptativa ao meio (Wisecaver *et al.*, 2014).

Para as linhagens de *S. cerevisiae*, PM01 e MC1, a assimilação de melibiose não é esperada (Sampaio *et al.*, 2017). Na ausência de sinais morfológicos de contaminação, somada a incerteza em relação a ensaios fenotípicos serem suficientes para distinguir leveduras *Saccharomyces* como *ale* ou *lager* (Gallone *et al.*, 2017; Nakao *et al.*, 2009), sugere-se que a classificação seja inconclusiva. Nesse caso, duas principais hipóteses devem ser investigadas para diminuir a incerteza quando a classificação dessas cepas; primeiramente sobre a hipótese de contaminação indistinguível morfológicamente; e segundo, sobre a hipótese de que a identificação a partir da região do ITS não seja suficiente para diferenciação entre linhagens de *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*, sendo assim, necessárias análises de outras regiões do genoma (Gallone *et al.*, 2017 e Kopecká *et al.*, 2016)

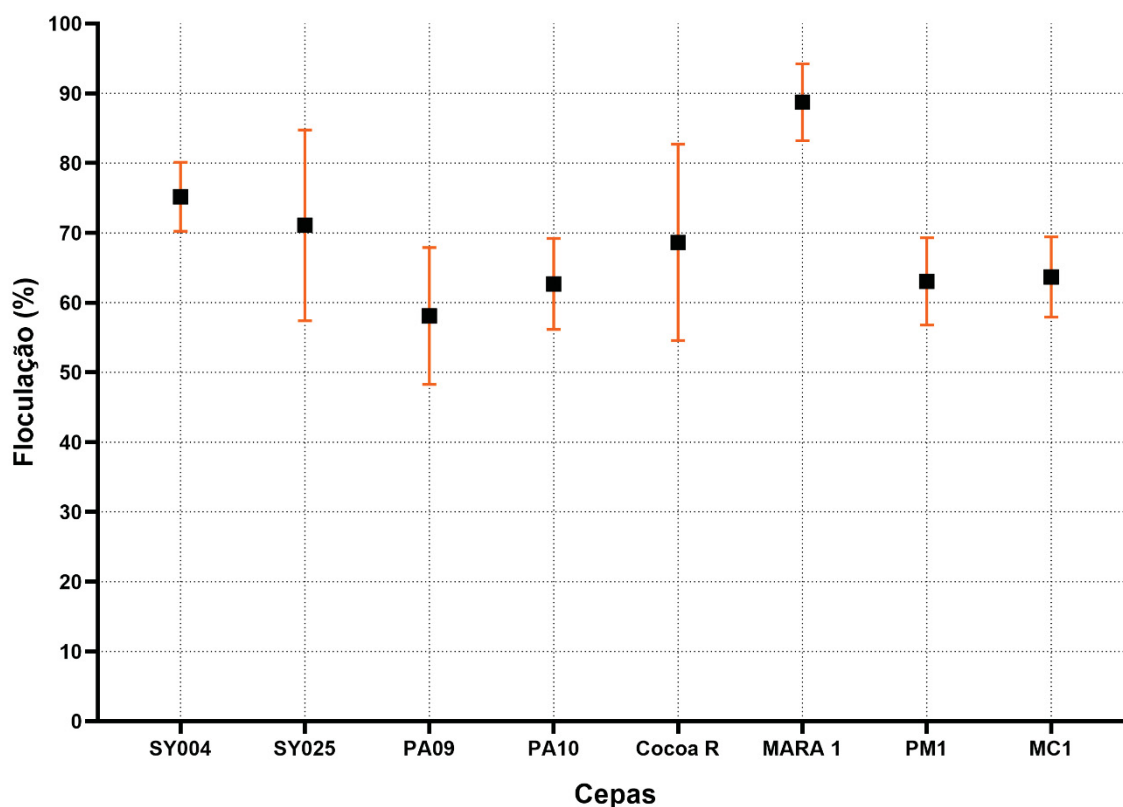
#### 4.8 ENSAIO DE FLOCULAÇÃO COM EDTA

Os resultados aqui apresentados têm como objetivo a caracterização da floculação, para direcionamento da aplicação em potencial, visto que diferentes estilos de cerveja podem contar com leveduras de uma ampla variedade de perfis de floculação, atendendo, por exemplo, a especificações de aspecto visual. Com as médias de floculação de cada linhagem, em triplicata, foi possível a comparação do nível de floculação com os grupos apontados (ver item 2.1.5) por Verstrepen e Derdelinckx; *et al.* (2003). O princípio da técnica empregada é ação reguladora do  $\text{Ca}^{2+}$  na floculação, usando da propriedade quelante do EDTA para inibir a floculação para posterior indução por meio da saturação o íon cátion de cálcio (ver item 2.1.5).

Todas as cepas apresentaram médias de porcentagem de floculação comparáveis às linhagens utilizadas na indústria, entre 40-90%, como apontado por Verstrepen; Derdelinckx, G.; *et al.* (2003). É possível também classificá-las com base nos padrões da *American Society of Brewing Chemistry* (ASBC), onde as linhagens PA09 (58%), PA10 (62%), Cocoa R (68%), PM01 (63%) e MC1 (63%), estariam no grupo de floculação moderada; e a linhagem MARA1 (88%), no grupo de leveduras muito floculentas (ASBC Technical Committee, 2011). A confiabilidade do método foi confirmada a partir da análise das cepas controle (SY004 e SY025), que apresentam

nível de floculação comercialmente comunicado como “médio”, reproduzido no ensaio (GRÁFICO 5).

GRÁFICO 5 – PORCENTAGENS DE FLOCULAÇÃO



FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: As linhagens com desvio padrão da média (IC de 95% e t-test,  $\alpha = 0,05$ , significativo) destacado em linhas laranja.

De acordo com os resultados observados neste trabalho, sugere-se que, para a melhor caracterização futura de cada cepa, sejam feitas mais observações, a fim de estabelecer com menos incerteza, além da classificação de nível de floculação pertencente, o nível de floculação médio. A importância do tamanho do universo amostral, nesse caso, para além de fins estritamente estatísticos, está relacionada à instabilidade que o perfil de floculação pode demonstrar entre gerações de repique. Isso ocorre por uma questão de envelhecimento celular, em que células mais velhas podem exibir tamanho celular maior, se comparadas a células mais jovens, resultando em maiores concentrações de quitina na membrana e, por consequência, maior habilidade de adesão intercelular pela aumento da

hidrofobicidade (Powell *et al.*, 2003), ou por instabilidades genotípicas ligadas ao gene Ig-FLO1, que levam à mudança do fenótipo de floculação, como observado por Sato *et al.* (2001).

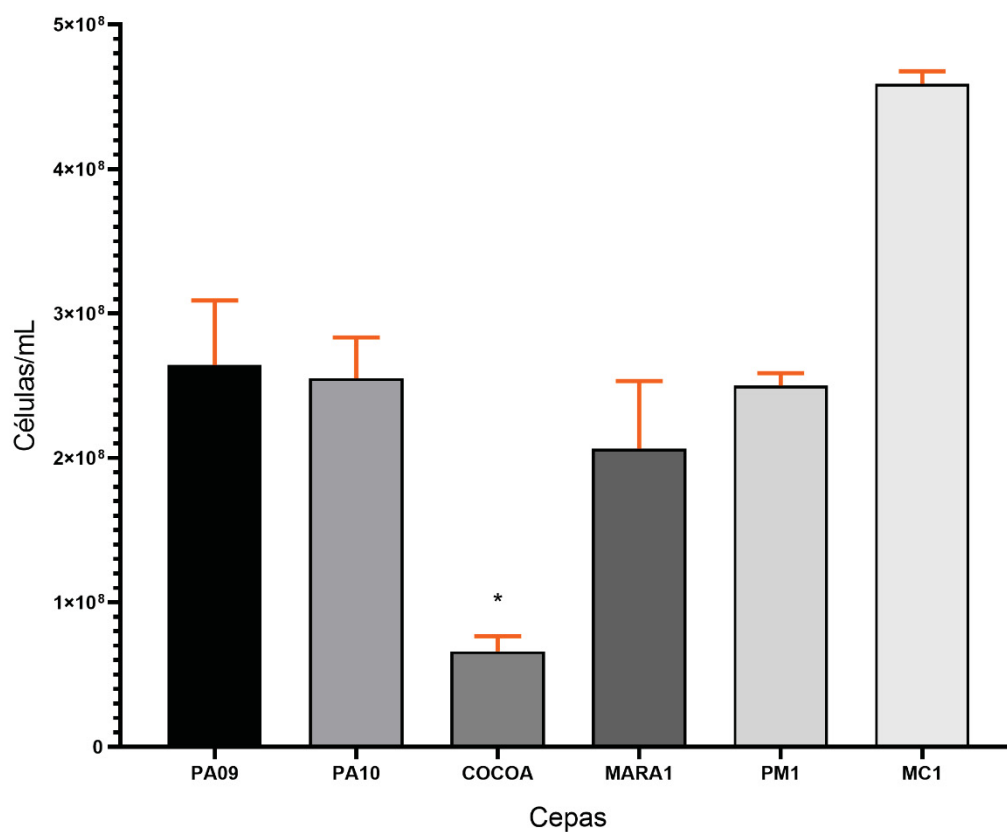
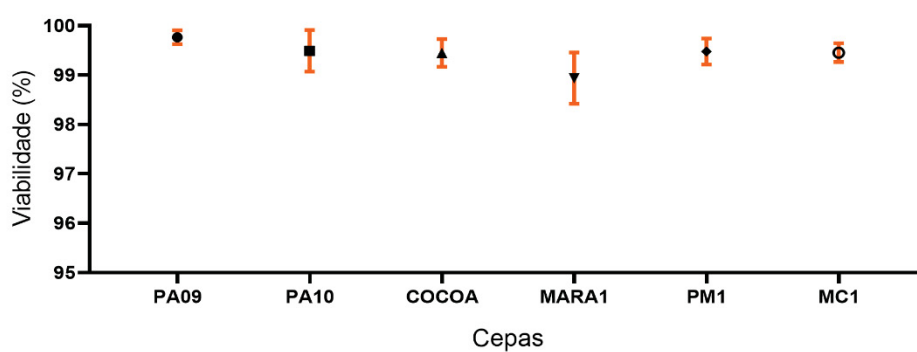
#### 4.9 PROPAGAÇÃO CELULAR

A propagação celular é um parâmetro chave para o processo de fermentação, pois é essencial para alcançar a adequada concentração de inóculo para iniciar o processo (Quain, 2017).

No ensaio de propagação, a maior parte das cepas alcançou números satisfatórios relativos à concentração celular, no intervalo de  $2,06 \times 10^8$  a  $4,59 \times 10^8$  células/mL, e com viabilidade >98%, quando comparados aos números indicados como propagações bem sucedidas,  $2,0 \times 10^8$  células/mL e com alta viabilidade celular (>95%) por Quain (2017). A única exceção foi a cepa Cocoa R que, apesar de apresentar uma elevada viabilidade celular (>99%), teve uma média de concentração abaixo da desejada, alcançando  $6,6 \times 10^7$  células/mL (GRÁFICO 6).

Apesar das limitações comparativas dos ensaios em escala laboratorial com os em escala de operação completa (Smart, 2017), e do ensaio realizado ter elevado a escala de propagação apenas até a escala laboratorial baseada em (Quain, 2017), para fins de triagem do potencial de uso na indústria cervejeira, usamos o a concentração celular e viabilidade referência citada anteriormente para fazer uma nova triagem entre as cepas. Consequentemente, nessa nova etapa e nas subsequentes a cepa Cocoa R foi excluída das investigações.

GRÁFICO 6 – CONCENTRAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR.

**A****B**

FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: (A) Médias das concentrações celulares (células/mL) alcançadas pelas cepas. Desvio padrão da média destacado em linhas laranjas, com intervalo de confiabilidade de 95%. (B) Viabilidade celular (%) de cada cepa, com adição do desvio padrão da média.

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE CARBOIDRATOS POR HPLC-RID

Após o cessar da fermentação primária, foi avaliado o consumo de carboidratos do mosto estéril (Weyermann® *Special Malts*, 2019), a 12,5 °P, por HPLC-RID (TABELA 11). Uma vez que o método cromatográfico utilizado não é capaz de diferenciar os monossacarídeos frutose e glucose e os dissacarídeos maltose e sacarose (sobreposição nos tempos de retenção), os resultados são apresentados considerando o consumo de carboidratos a nível de seus tamanhos moleculares. De qualquer forma é importante destacar que a composição do mosto cervejeiro contempla baixas percentagens de frutose e sacarose (1-2% de cada um).

TABELA 11 – CONSUMO DE CARBOIDRATOS DO MOSTO PELAS CEPAS AVALIADAS

Tipo de carboidrato	Padrão de referência	Consumo médio (% +SEM) das cepas				
		PA09	PA10	MARA1	MC1	PM01
Monossacarídeo	Glucose <sup>a</sup>	92,6 (0,6)	77,5 (0,5)	90,4 (0,1)	69,8 (7,6)	89,8 (0,4)
Dissacarídeo	Maltose <sup>a</sup>	97,7 (0,4)	73,1 (0,8)	98,8 (0,1)	72,7 (8,4)	98,2 (0,1)
Trissacarídeo	Maltotriose <sup>a</sup>	14,0 (7,3)	21,0 (3,1)	25,0 (7,7)	9,7 (3,9)	11,9 (3,6)

FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: Médias de consumo de carboidratos do mosto estéril (Weyermann® *Special Malts*, 2019), a 12,5 °, acompanhadas de desvio padrão da média; (a) padrões Sigma-Aldrich para HPLC. Os limites de quantificação para os três padrões são  $4,93 \times 10^{-3}$  mg/mL para glucose,  $2,20 \times 10^{-3}$  mg/mL para maltose e  $1,33 \times 10^{-2}$  mg/mL para maltotriose. SEM, é referente a desvio padrão da média, do inglês *Standard error of mean*.

Os monossacarídeos foram fermentados em diferentes proporções pelas leveduras investigadas, com destaque positivo para as cepas PA09 e MARA1, cujos consumos foram maiores que 90%, em relação a concentração inicial. Para os dissacarídeos, destacaram-se as cepas PA09, MARA1 e PM01, todas com consumo acima de 95% do extrato inicial. O consumo de maltotriose, entretanto, mostrou-se pouco promissor por todas as cepas, apresentando o maior consumo médio pela cepa MARA1, com 25%.



Em termos de potencial para a indústria cervejeira, o consumo alto de glucose e maltose é habilidade elementar para qualquer levedura (Stewart, 2017). Por outro lado o consumo de maltotriose é desejável, mas não necessariamente o consumo completo (Sampaio *et al.*, 2017). Somando ao fato de que leveduras não-convencionais tendem a demonstrar baixos níveis de fermentação se comparadas a leveduras domesticadas, é possível destacar as leveduras PA09, MARA1 e PM01 como leveduras com potencial aceitável de consumo de carboidratos.

#### 4.11 ATENUAÇÃO APARENTE E ESTIMATIVA DE TEOR ALCOÓLICO

Ao investigar a atenuação aparente das cepas, assim como a estimativa de teor alcoólico, os resultados obtidos demonstraram baixos índices de ambas características (TABELA 12), quando comparados com leveduras *Saccharomyces* convencionais. Esse resultado pode ser considerado esperado, em se tratando de leveduras não-convencionais, o que, portanto, não exclui seus potenciais (Iattici *et al.*, 2020).

TABELA 12 – TEOR ALCOÓLICO E ATENUAÇÃO APARENTE

Amostra/Cepa	Densidade (mg/mL)	Gravidade específica	Teor alcoólico (ABV (%))	Extrato aparente (°P) <sup>a</sup>	Atenuação aparente (%)
Mosto não-fermentado	1,049 (0,000)	1,051 (0,000)	0	12,5	-
PA09	1,022 (0,003)	1,023 (0,002)	3,592 (0,347)	6,0	52,76 (5,10)
PA10	1,027 (0,000)	1,029 (0,000)	2,899 (0,002)	7,0	42,58 (0,04)
MARA1	1,017 (0,000)	1,018 (0,000)	4,249 (0,002)	4,5	62,42 (0,02)
MC1	1,024 (0,000)	1,026 (0,000)	3,213 (0,002)	6,5	47,19 (0,03)
PM01	1,018 (0,000)	1,020 (0,000)	4,088 (0,001)	5,0	60,06 (0,01)

FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: Médias acompanhadas de desvio padrão entre parênteses; <sup>a</sup>Medidas de °P são apresentadas em intervalos de 0,5, por isso os valores foram arredondados.

Com relação à estimativa de teor alcoólico alcançado ao fim da fermentação primária do mosto, as cepas exibiram concentrações alcoólicas mais elevadas que cervejas obtidas com cepas não-convencionais já utilizadas no mercado cervejeiro, como é o caso da espécie *Torulaspora delbrueckii* (White Labs, 2020), cujo perfil de teor alcoólico gira em torno de 2,66% (v/v) e cujo uso é valorizado principalmente por conta do seu impacto nas características sensoriais do produto final (Canonico *et al.*, 2016).

Quanto à atenuação, destacam-se nessa investigação as cepas PA09, MARA1 e PM01, que apesar de apresentarem consumo de monossacarídeos e dissacarídeos acima de 90% (Tabela 11), apresentaram perfis de baixa atenuação aparente. Esses dados podem indicar uma rota metabólica que não atinge, como produto final, uma proporcionalidade direta do consumo de maltose em conversão alcoólica como o esperado em leveduras convencionais (Boulton, 2017 e Iattici *et al.*, 2020). Da mesma forma sugerem que possa ser causado por uma não domesticação dessas linhagens à formação de etanol, uma vez que esse fenótipo tem sido otimizado por domesticação por milhares de anos (Gallone *et al.*, 2016). Isto vale até mesmo para linhagens de *S. cerevisiae*, como as citadas, uma vez que estudos genealógicos entre linhagens sugerem que a espécie não é completamente domesticada (Fay; Benavides, 2005).

A partir desses dados, descarta-se a aplicação das cepas que estão sendo avaliadas em fermentações completas, uma vez que atenuações aparentes esperadas para mosto de 12 °P estejam pelo menos em torno de 70-85% (Michel, 2017). Entretanto, essa característica, se somada às tolerâncias alcoólicas encontradas, reforçam a hipótese de uso potencial com objetivo de consumo de carboidratos, com destaque para a produção dos compostos ativos, sem grande incremento da concentração alcoólica, em pós-fermentação ou fermentação sequencial (Holt *et al.*, 2018 e Michel, 2017). Essa estratégia permite a obtenção de um fermentado mais seco (sem ou baixo dulçor, sensorialmente), sem que se obtenham concentrações de etanol elevadas.

#### 4.12 QUANTIFICAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE FERMENTAÇÃO POR GC-FID

A quantificação dos subprodutos de fermentação foi realizada na empresa Bio4-Soluções Biotecnológicas e teve como alvos de detecção um composto

carbonílico, um acetato e três álcoois superiores de relevância na indústria (curvas de calibração no ANEXO 3.B e cromatogramas no APÊNDICE). A avaliação teve um caráter parcial, uma vez que vários outros subprodutos podem ser produzidos ao longo da fermentação. Os dados obtidos são apresentados na TABELA 13, com medidas de concentração de acetatos e álcoois superiores de cada cepa, obtidas a partir das misturas homogêneas de três observações, sem intervalos de confiança (principalmente devido a limitações de estrutura impostas pelo número de amostras), e acompanhados dos limiares de percepção organoléptica.

TABELA 13 – SUBPRODUTOS DE FERMENTAÇÃO DO MOSTO

Composto	Descritor Sensorial	PA09 (mg/L)	PA10 (mg/L)	MARA1 (mg/L)	MC1 (mg/L)	PM01 (mg/L)	Limiar organoléptico (mg/L)
Acetaldeído	Maçã verde, frutado	30,783	13,153	13,835	12,916	39,176	25 <sup>a</sup>
Acetato de etila	Solvente, frutado, doce	18,641	20,119	18,181	17,026	12,599	30 <sup>a</sup>
1-propanol	Álcool	28,256	26,258	22,072	18,348	21,658	800 <sup>a</sup>
Isobutanol	Álcool	19,641	14,120	13,723	16,629	10,950	200 <sup>a</sup>
Álcool isoamílico	Álcool	63,720	42,635	45,858	40,773	41,156	65 <sup>b</sup>
Total de Álcoois superiores	Álcool	111,618	83,0151	81,654	75,752	73,765	-

FONTE: Autor, 2020.

LEGENDA: Os limites de quantificação para os padrões são 4,38 mg/L para acetaldeído, 3,27 mg/L para acetato de etila, 2,62 mg/L para 1-propanol, 2,52 mg/L para isobutanol e 2,02 mg/L para álcool isoamílico. (a) Olaniran et al. (2017) e (b) Michel (2017).

Nessa investigação, destacam-se negativamente as leveduras PA09 e PM01, ambas apresentando uma alta produção de acetaldeído, composto carbonílico ativo indesejável quando acima de seu *threshold* relativo (25 mg/L) em fermentações convencionais, por apresentar odores descritos com “gramínea” (Olaniran *et al.*, 2017) e com possíveis efeitos mutagênicos no DNA mitocondrial das leveduras (Ristow *et al.*, 1995). Apesar disso, ambas leveduras apresentaram consumos médios de monossacarídeos e dissacarídeos de aproximadamente 90,4 e 88,2%, respectivamente (TABELA 11); perfil de floculação média (GRÁFICO 5);  $\mu_{\max}$  comparáveis com a linhagem comercial de referência (GRÁFICO 4) e tolerância alcoólica de no mínimo 5% (v/v), para PM01, e 10% (v/v), para PA09 (TABELA 9). Todas essas características advogam no sentido de se investigar mais a fundo as causas da produção excessiva de acetaldeído nas duas cepas, para que não sejam descartadas de imediato. Afinal, o uso em pós-fermentações parece viável, primeiro por conta da tolerância alcoólica, mas também devido à tendência de aumento da produção de acetaldeído na presença de oxigênio (Curiel *et al.*, 2016 e Romano *et al.*, 1999), comum na fase *log* do crescimento de uma fermentação primária, o que seria minimizado caso a aplicação das cepas fosse em uma fermentação secundária.

Além disso, a produção média de acetato de etila da cepa PA09 (18,6 mg/L), assim como a soma da produção de álcoois superiores de ambas as cepas, são similares às concentrações médias encontradas em cervejas fermentadas por *S. pastorianus* com extrato inicial de 12 °P, 19 mg/L para acetato de etila e entre 50-136 mg/L na soma de álcoois superiores (Michel, 2017; Narziß *et al.*, 2017; Rehm, 1967 e Renger *et al.*, 1992).

Acerca da produção de acetato de etila, um solvente com várias aplicações industriais devido ao seu impacto amigável ao meio ambiente (Löser *et al.*, 2014), a cepa PM01 foi a que menos se destacou entre as cepas investigadas, as quais apresentaram produção de 12,6 a 20,1 mg/L, enquanto que a média encontrada na fermentação (extrato original de 12 °P) de *S. pastorianus* foi de 19 mg/L ((Michel, 2017; Narziß *et al.*, 2017; Rehm, 1967 e Renger *et al.*, 1992), e em leveduras não-*Saccharomyces*, como *Torulaspora delbrueckii* e *Brettanomyces anomala*, a produção é de 23,4 e 20,9 mg/L, respectivamente (Michel *et al.*, 2016 e Yakopson, 2010). Visto que fermentações de cervejas com *S. cerevisiae* chegam a uma produção de 29 mg/L de acetato de etila, sob as mesmas condições, próximo ao

linear organoléptico (30 mg/L), as cepas investigadas não se mostram potenciais produtoras desse composto a nível de fermentação primária, além da característica principal de atenuação; porém, principalmente em se tratando das cepas PA09 e MC1 (com tolerância alcoólica de pelo menos 10% v/v), poderiam ser candidatas a agentes de potencialização dessa característica, e outras, durante fermentações subsequentes, como na maturação, por exemplo.

Em relação aos álcoois superiores, em especial o álcool isoamílico, com descritor organoléptico de óleo fúsel, éster e banana/frutas amarelas (Charalambous & Inglett, 1983; Dzialo *et al.*, 2017; FlavorActiv, 2020 e Olaniran *et al.*, 2017), a produção de todas as cepas em investigação ficou dentro do intervalo de produção associado à *S. pastorianus*, tanto para álcool isoamílico (38-100 mg/mL) quanto para a soma de álcoois superiores (50-136 mg/mL), em fermentações de extrato original de 12 °P (Michel, 2017 e Renger *et al.*, 1992). Destaca-se a cepa PA09 que, na soma da produção média, superou a de outras cepas não-convencionais como *B. bruxellensis* (26,12 mg/mL), e *T. delbruecki* (101,82 mg/mL) (Michel, 2017; Michel *et al.*, 2016 e Yakopson, 2010).

É perceptível, quando se comparam os dados obtidos no ensaio de atenuação (TABELA 12) e no de metabólitos secundários (TABELA 13) com os da literatura, a tendência de produção de álcoois superiores e acetato em detrimento da concentração final de etanol, como observado por Gamero *et al.* (2016), em triagem de 143 espécies de leveduras não-convencionais. Essa característica pode estar ligada ao fato de que as leveduras desse tipo não passaram por processos de domesticação direcionados à produção de etanol como as cepas industriais (Gallone *et al.*, 2016). Esses dados destacam o potencial de adição de compostos ativos extras para mudanças no *bouquet* de aromas de cervejas e manutenção da concentração de etanol em níveis médios (Dzialo *et al.*, 2017 e Michel, 2017).

#### 4.13 CONCLUSÃO

A fim de reunir as características de destaque dos resultados apresentados, são aqui apresentados um resumo de cada cepa investigada até o final desse processo (Tabela 14).

TABELA 14 – RESUMO DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DAS CEPAS AVALIADAS

Cepa	Espécie	Floculação	Tolerância Alcoólica 5%      10%	Assimilação de melibiose	Atenuação Aparente (%)	Destques
PA10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Média	+	-	52,76	Acetaldeído acima do <i>threshold</i> , alto consumo de mono- e dissacarídeos, concentração de álcool superiores e produção de acetato de etila semelhantes a <i>Saccharomyces pastorianus</i> . Propícia para fermentação secundária.
PA09			+	-	42,58	Consumo de 20% de maltotriose
MARA1			+	-	62,42	Maior atenuação entre as cepas, atingindo maior teor alcoólico (4,25%), consumo de 25% da maltotriose
MC1			+	+	47,19	Alta concentração após propagação em escala laboratorial, fermentação secundária
PM1			+	+	60,06	Acetaldeído acima do <i>threshold</i> , alto consumo de mono- e dissacarídeo

FONTE: O Autor (2020).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, as cepas derivadas de matrizes brasileiras investigadas até aqui demonstram, em fermentação de mosto, potencial que as qualificam para investigações relacionadas a fermentações secundárias, principalmente devido às suas características de tolerância alcoólica e perfis de metabólitos secundários (Holt *et al.*, 2018 e Michel, 2017). No entanto, não é possível afirmar quanto ao total potencial dessas cepas na indústria, no sentido mais restrito do produto final, devido à limitação da escala laboratorial em mimetizar as condições da escala industrial (Smart, 2017), além da complexidade e das especificações intrínsecas de cada tipo de cerveja, sejam artesanais ou não (Brewers Association, 2020).

Diante disso investigações realizadas nesse trabalho apresentaram cepas de leveduras não-convencionais como candidatas, em maior ou menor grau, para o uso em fermentações alternativas na indústria cervejeira, comparando-as com cepas já utilizadas comercialmente nessa indústria e/ou com trabalhos relacionados à prospecção de leveduras para fins similares.

Apesar de revogado pelo Decreto nº 9.902, de 8 de julho 2019, da Presidência da República do Brasil, o parágrafo único da legislação brasileira que proibia o uso de aromatizantes, flavorizantes e corantes artificiais em cervejas, o uso de componentes ativos com impacto organoléptico a partir de fontes naturais e de processos biotecnológicos continua a ser tendência em pesquisa e no mercado de alimentos e bebidas. Por isso, a continuidade e o aprofundamento dos esforços em investigar os microrganismos derivados de matrizes da biodiversidade brasileira para esses fins, como foi a essência desse trabalho, é fundamental pela convergência de aspectos econômicos e valorização simbólica de nossos recursos naturais.

### 5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como já dito anteriormente, recomenda-se o aprofundamento das investigações no que diz respeito às características de cada cepa – no intuito de acumular mais informações acerca de suas propriedades individuais –, e também a otimização da estrutura de ensaios para escalas industriais. Entre as recomendações, mais especificamente, estão:



- Investigação da viabilidade, eficiência e impactos de co-fermentação com leveduras convencionais;
- Impacto da produção de cerveja no comportamento fisiológico das cepas não-convencionais;
- Ampla investigação dos subprodutos de fermentação em mosto;
- Ampla investigação dos subprodutos de fermentação em cerveja ale e/ou *lager*;
- Aprofundamento em aspectos como tolerância alcoólica e floculação;
- Análise do produto final com uma receita padrão de estilo pré-selecionado.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, M. R.; NAKAJIMA, M.; KOJIMA, S.; HOMMA, M.; FUKUDA, T. The effects of cell sizes, environmental conditions, and growth phases on the strength of individual W303 yeast cells inside ESEM. **IEEE Transactions on Nanobioscience**, v. 7, n. 3, p. 185–193, 2008.

ALBA-LOIS, L.; SEGAL-KISCHINEVZKY, C.; CIENCIAS, M. S. F. DE. Yeast Fermentation and the Making of Beer and Wine yeast to create beer and wine from grains and fruits . What are the The History of Beer and Wine Production. **Yeast, Fermentation, Beer, Wine**, v. 9, n. June, p. 1–5, 2010.

ALI, W. A.; JAFF, B. M. A. A.-; ALSAEEDI, S. Detection of Unculturable Fungi in Soil Regions of Aziz Awa in Sulaimani province. **Tikrit Journal of Pure Science**, v. 23, n. December, 2018.

ALVAREZ, F.; DA MATA CORREA, L. F.; MACEDO ARAÚJO, T.; et al. Variable flocculation profiles of yeast strains isolated from cachaça distilleries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 190, p. 97–104, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.024>>. .

ANDO, H.; HATANAKA, K.; OHATA, I.; et al. Antifungal activities of volatile substances generated by yeast isolated from Iranian commercial cheese. **Food Control**, v. 26, n. 2, p. 472–478, 2012. Elsevier.

ANNEMÜLLER, G.; MANGER, H.-J.; LIETZ, P. **Die Hefe in der Brauerei : Hefemanagement, Kulturhefe - Hefereinzucht, Hefepropagation im Bierherstellungsprozess**. VLB, 2008.

ARAÚJO, T. M.; SOUZA, M. T.; DINIZ, R. H. S.; et al. Cachaça yeast strains: alternative starters to produce beer and bioethanol. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 111, n. 10, p. 1749–1766, 2018.

ATA, Ö.; REBNEGGER, C.; TATTO, N. E.; et al. A single Gal4-like transcription factor activates the Crabtree effect in *Komagataella phaffii*. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2018. Nature Publishing Group.

BAKKER, B. M.; OVERKAMP, K. M.; VAN MARIS, A. J. A.; et al. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* . **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 15–37, 2001. Oxford University Press (OUP).

BENDIAK, D. S.; BENDIAK, D. S.; BREWERIES, M.; CENTRE, T. S.; DRIVE, C. Quantification of the Helm's Flocculation Test. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 52, p. 12–15, 1994.

BENNETZEN, J. L.; HALL, B. D. The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 6, p. 3018–3025, 1982.

BESTER, M. C.; PRETORIUS, I. S.; BAUER, F. F. The regulation of *Saccharomyces cerevisiae* FLO gene expression and Ca<sup>2+</sup>-dependent flocculation by Flo8p and Mss11p. **Current Genetics**, v. 49, n. 6, p. 375–383, 2006. Springer, Springer Nature.

BOULTON, C. Brewing Yeast Physiology. **Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology**, 2017. Caister Academic Press.

BOULTON, C. (CHRISTOPHER M. .; QUAIN, D. **Brewing Yeast and Fermentation**. Wiley, 2008.

BRÁNYIK, T.; VICENTE, A. A.; DOSTÁLEK, P.; TEIXEIRA, J. A. A review of flavour formation in continuous beer fermentations. **Journal of the Institute of**

**Brewing**, 1. jan. 2008. John Wiley and Sons Inc. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00299.x>>. Acesso em: 9/3/2020.

BRASIL. DOU 23/11/2018 - Pg. 93 - Seção 3 | Diário Oficial da União | Diários Jusbrasil. Disponível em: <<https://www.jusbrasil.com.br/diarios/218735628/dou-secao-3-23-11-2018-pg-93?ref=goto>>. Acesso em: 31/8/2020.

BREWERS ASSOCIATION. Brewers association - 2019 beer style guidelines. 2019, p. 55, 2020. Disponível em: <<https://www.brewersassociation.org/resources/brewers-association-beer-style-guidelines/>>. .

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing: Science and Practice**. 2004.

BUTLER, P. R.; BROWN, M.; OLIVER, S. G. Improvement of antibiotic titers from *Streptomyces* bacteria by interactive continuous selection. **Biotechnology and bioengineering**, v. 49, n. 2, p. 185–96, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18623568>>. Acesso em: 7/3/2020.

CAMPO, E.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Solid phase extraction, multidimensional gas chromatography mass spectrometry determination of four novel aroma powerful ethyl esters. Assessment of their occurrence and importance in wine and other alcoholic beverages. **Journal of Chromatography A**, v. 1140, n. 1–2, p. 180–188, 2007. Elsevier.

CAMPOS, A. P. R.; CARMO, J. R. DO; MATTIETTO, R. DE A.; CARVALHO, A. V. Caracterização físico-química do tucupi durante as etapas de processamento. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2017.

CANETTA, E.; ADYA, A. K.; WALKER, G. M. Atomic force microscopic study of the effects of ethanol on yeast cell surface morphology. **FEMS Microbiology Letters**, v. 255, n. 2, p. 308–315, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16448511>>. Acesso em: 11/3/2020.

CANONICO, L.; AGARBATI, A.; COMITINI, F.; CIANI, M. *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. **Food Microbiology**, v. 56, p. 45–51, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.12.005>>. .

CANONICO, L.; CIANI, E.; GALLI, E.; COMITINI, F.; CIANI, M. Evolution of Aromatic Profile of *Torulaspora delbrueckii* Mixed Fermentation at Microbrewery Plant. **Fermentation**, v. 6, n. 1, p. 7, 2020.

CANONICO, L.; COMITINI, F.; CIANI, M. *Torulaspora delbrueckii* contribution in mixed brewing fermentations with different *Saccharomyces cerevisiae* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 259, p. 7–13, 2017. Elsevier B.V.

CAPECE, A.; ROMANIELLO, R.; PIETRAFESA, A.; et al. Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. **International Journal of Food Microbiology**, v. 284, n. July, p. 22–30, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.028>>. .

CHARALAMBOUS, G.; INGLETT, G. **Instrumental Analysis of Foods V1: Recent progress - Google Livros**. Volume 1 ed. Academic Press, 1983.

CHARRON, M. J.; READ, E.; HAUT, S. R.; MICHELS, C. A. Molecular evolution of the telomere-associated MAL loci of *Saccharomyces*. **Genetics**, v. 122, n. 2, p. 307–316, 1989.

CHERRY, J. M.; HONG, E. L.; AMUNDSEN, C.; et al. *Saccharomyces* Genome Database: The genomics resource of budding yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, 2012.

CHEUNG, A. W. Y.; BROSNAN, J. M.; PHISTER, T.; KATHERINE, S. Impact of dried, creamed and cake supply formats on the genetic variation and ethanol tolerance of three *Saccharomyces cerevisiae* distilling strains. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, n. 2, p. 152–162, 2012. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jib.23>>. Acesso em: 11/3/2020.

CHI, Z.; ARNEBORG, N. Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 1047–1052, 1999.

CURIEL, J. A.; SALVADÓ, Z.; TRONCHONI, J.; et al. Identification of target genes to control acetate yield during aerobic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 156, 2016. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27627879>>. Acesso em: 10/3/2020.

D'AMORE, T.; PANCHAL, C. J.; STEWART, G. G. Intracellular ethanol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 1, p. 110–114, 1988. American Society for Microbiology (ASM).

D'AMORE, T.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. Sugar utilization by yeast during fermentation. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 315–323, 1989. Springer-Verlag.

D'HAUTCOURT, O.; SMART, K. A. Measurement of brewing yeast flocculation. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 57, n. 4, p. 123–128, 1999.

DASHKO, S.; ZHOU, N.; COMPAGNO, C.; PIŠKUR, J. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 6, p. 826–832, 2014. Blackwell Publishing Ltd. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/1567-1364.12161>>. Acesso em: 21/4/2020.

DEAK, T. **Handbook of Food Spoilage Yeasts**. 2nd ed. CRC Press, 2007.

DENGIS, P. B.; NELISSEN, L. R.; ROUXHET, P. G. Mechanisms of yeast flocculation: Comparison of top- and bottom-fermenting strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 718–728, 1995. American Society for Microbiology (ASM).

DIETVORST, J.; LONDESBOROUGH, J.; STEENSMA, H. Y. Maltotriose utilization in lager yeast strains: MTTI encodes a maltotriose transporter. **Yeast**, v. 22, n. 10, p. 775–788, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16088872>>. Acesso em: 24/2/2020.

DUAN, S. F.; HAN, P. J.; WANG, Q. M.; et al. The origin and adaptive evolution of domesticated populations of yeast from Far East Asia. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2018. Nature Publishing Group.

DUDEN, A. S.; VERWEIJ, P. A.; FAAIJ, A. P. C.; et al. Biodiversity Impacts of Increased Ethanol Production in Brazil. **Land**, v. 9, n. 1, p. 12, 2020. MDPI AG. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-445X/9/1/12>>. Acesso em: 6/3/2020.

DZIALO, M. C.; PARK, R.; STEENSELS, J.; LIEVENS, B.; VERSTREPEN, K. J. Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. February, p. S95–S128, 2017.

EBC, A. Dimethyl Sulphide and Other Lower Boiling Point Volatile Compounds in Beer by Gas Chromatography. **Analysis**, p. 5–8, 1987.

EHRlich, F. Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren

Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 40, n. 1, p. 1027–1047, 1907. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cber.190704001156>>. Acesso em: 9/3/2020.

ELENA, S. F.; LENSKI, R. E. Evolution experiments with microorganisms: The dynamics and genetic bases of adaptation. **Nature Reviews Genetics**, 1. jun. 2003. Nature Publishing Group.

EVANS, D. E.; HAMET, M. A. G. The Selection of a Dried Yeast Strain for Use in the Apparent Attenuation Limit Malt Analysis (AAL) Procedure. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 111, n. 2, p. 209–214, 2005. John Wiley and Sons Inc. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00668.x>>. Acesso em: 27/4/2020.

FAY, J. C.; BENAVIDES, J. A. Evidence for Domesticated and Wild Populations of *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS Genetics**, v. 1, n. 1, p. e5, 2005. Public Library of Science. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.0010005>>. Acesso em: 7/3/2020.

Fermentos – Bio4. Disponível em: <<https://bio4.com.br/leveduras/>>. Acesso em: 26/2/2020.

FERNANDES, L.; CÔRTE-REAL, M.; LOUREIRO, V.; LOUREIRO-DIAS, M. C.; LEÃO, C. Glucose respiration and fermentation in *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae* express different sensitivity patterns to ethanol and acetic acid. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 249–253, 1997. Wiley. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9351272>>. Acesso em: 11/3/2020.

FLAVORACTIV. FlavorActiV Beer Sensory Management. Disponível em: <<https://www.flavoractiv.com/beverage/beer/>>. Acesso em: 8/3/2020.

FOX, G. The Brewing Industry and the Opportunities for Real-Time Quality Analysis Using Infrared Spectroscopy. **Applied Sciences**, v. 10, n. 2, p. 616, 2020.

DE FRANCESCO, G.; TURCHETTI, B.; SILEONI, V.; MARCONI, O.; PERRETTI, G. Screening of new strains of *Saccharomyces ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, n. 1, p. 113–121, 2015.

GALLONE, B.; MERTENS, S.; CRAUWELSE, S.; et al. Genomics and Evolution of Beer Yeasts. **Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology**, 2017. Caister Academic Press.

GALLONE, B.; STEENSELS, J.; PRAHL, T.; et al. Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. **Cell**, v. 166, n. 6, p. 1397–1410.e16, 2016. Cell Press.

GAMERO, A.; QUINTILLA, R.; GROENEWALD, M.; et al. High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. **Food Microbiology**, v. 60, p. 147–159, 2016. Academic Press.

GASSLER, T.; SAUER, M.; GASSER, B.; et al. The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO<sub>2</sub>. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 210–216, 2020. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41587-019-0363-0>>.

GEE, D. A.; RAMIREZ, W. F. A FLAVOUR MODEL FOR BEER FERMENTATION. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 100, n. 5, p. 321–329, 1994. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.1994.tb00830.x>>. Acesso em: 9/3/2020.



GIBSON, B.; DAHABIEH, M.; KROGERUS, K.; et al. Adaptive Laboratory Evolution of Ale and Lager Yeasts for Improved Brewing Efficiency and Beer Quality. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 11, n. 1, p. 1–22, 2020.

GODDARD, M. R.; GREIG, D. Editor's choice: *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche? **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 3, 2015. Oxford University Press.

GONÇALVES, M.; PONTES, A.; ALMEIDA, P.; et al. Distinct Domestication Trajectories in Top-Fermenting Beer Yeasts and Wine Yeasts. **Current Biology**, v. 26, n. 20, p. 2750–2761, 2016.

HALL, B. G.; ACAR, H.; NANDIPATI, A.; BARLOW, M. Growth rates made easy. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31, n. 1, p. 232–238, 2014.

HALL, J. D.; FUČÍKOVÁ, K.; LO, C.; LEWIS, L. A.; KAROL, K. G. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. **Cryptogamie, Algologie**, v. 31, n. 4, p. 529–555, 2010.

HAN, E. -K.; COTTY, F.; SOTTAS, C.; JIANG, H.; MICHELS, C. A. Characterization of AGT1 encoding a general  $\alpha$ -glucoside transporter from *Saccharomyces*. **Molecular Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 1093–1107, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8594329>>. Acesso em: 24/2/2020.

HE, Y.; DONG, J.; YIN, H.; et al. Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer - a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 3, p. 157–163, 2014. John Wiley and Sons Inc. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jib.145>>. Acesso em: 21/4/2020.

HEBLY, M.; BRICKWEDDE, A.; BOLAT, I.; et al. *S. cerevisiae* × *S. eubayanus* interspecific hybrid, the best of both worlds and beyond. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 3, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25743788>>. Acesso em: 7/3/2020.

HELD, P. Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of *Saccharomyces Cerevisiae*. **BioTek Instruments**, , n. 18, p. 1–6, 2010. Disponível em: <[www.biotek.com](http://www.biotek.com)>.

HIMEDIA LABORATORIES. Yeast Nitrogen Base for microbiology. , 2015. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/51483?lang=it&region=IT>>.

VAN HOEK, P.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 4226–4233, 1998.

HOLT, S.; MIKS, M. H.; DE CARVALHO, B. T.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. The molecular biology of fruity and floral aromas in beer and other alcoholic beverages. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 3, p. 193–222, 2019.

HOLT, S.; MUKHERJEE, V.; LIEVENS, B.; VERSTREPEN, K. J.; THEVELEIN, J. M. Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. **Food Microbiology**, v. 72, p. 55–66, 2018.

HUA, S. S. T.; BECK, J. J.; SARREAL, S. B. L.; GEE, W. The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. **Mycotoxin Research**, v. 30, n. 2, p. 71–78, 2014. Springer-Verlag GmbH Co. KG. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24504634>>. Acesso em: 9/3/2020.

IATTICI, F.; CATALLO, M.; SOLIERI, L. Designing New Yeasts for Craft Brewing: When Natural Biodiversity Meets Biotechnology. **Beverages**, v. 6, n. 1, p. 3, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2306-5710/6/1/3>>.

IBEAS, J. I.; JIMENEZ, J. Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces* flor yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 7–12, 1997. American Society for Microbiology (ASM).

JACKSON, R. S. Wine Science: Principles and Applications - Ronald S. Jackson. . p.933, 2014.

JESÚS CALLEJO, M.; TESFAYE, W.; CARMEN GONZÁLEZ, M.; MORATA, A. Craft Beers: Current Situation and Future Trends. **New Advances on Fermentation Processes**, 2020. IntechOpen.

JIMÉNEZ, J.; LONGO, E.; BENÍTEZ, T. Induction of petite yeast mutants by membrane-active agents. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 12, p. 3126–32, 1988. American Society for Microbiology (ASM). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3066293>>. Acesso em: 11/3/2020.

JIN, Y. L.; SPEERS, R. A. Effect of environmental conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 58, n. 3, p. 108–116, 2000. Taylor & Francis.

JUNG, P. P.; CHRISTIAN, N.; KAY, D. P.; SKUPIN, A.; LINSTER, C. L. Protocols and Programs for High-Throughput Growth and Aging Phenotyping in Yeast. (J. Schacherer, Org.) **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119807, 2015. Public Library of Science. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0119807>>. Acesso em: 27/4/2020.

JURKOVÁ, M.; OLŠOVSKÁ, J.; ČEJKA, P. Determination of Sugars and Saccharides in Beer. **Kvasny Prumysl**, v. 64, n. 2, p. 58–64, 2018.

KIRIN. **Kirin beer DATA BOOK 2018**. Kirin Holdings Company, Limited, 2018.

KISPAL, G.; STEINER, H.; COURT, D. A.; ROLINSKI, B.; LILL, R. Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the myc oncogene-regulated Eca39 protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 40, p. 24458–24464, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8798704>>. Acesso em: 9/3/2020.

KOPECKÁ, J.; NĚMEC, M.; MATOULKOVÁ, D. Comparison of DNA-based techniques for differentiation of production strains of ale and lager brewing yeast. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 6, p. 1561–1573, 2016. Blackwell Publishing Ltd. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jam.13116>>. Acesso em: 28/4/2020.

KROGERUS, K.; MAGALHÃES, F.; VIDGREN, V.; GIBSON, B. Novel brewing yeast hybrids: creation and application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1. jan. 2017. Springer Verlag. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27885413>>. Acesso em: 7/3/2020.

LESKOVAC, V.; TRIVIÄ, S.; PERIÄ, D. The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 4, p. 481–494, 2002. Oxford University Press (OUP).

LIBKIND, D.; HITTINGER, C. T.; VALÉRIO, E.; et al. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 35, p. 14539–14544, 2011. National Academy of Sciences.

LIMA, J. Ministra Tereza Cristina instala Câmara da Cerveja — Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/ministra-tereza-cristina-instala-camara-da-serveja>>. Acesso em: 11/3/2020.

LIU, S.-Q. 17 - Impact of yeast and bacteria on beer appearance and flavour

A2 - Hill, Annie E. BT - Brewing Microbiology. In: A. E. Hill (Org.); **Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition**. p.357–374, 2015. Elsevier Ltd.

LÖSER, C.; URIT, T.; BLEY, T. Perspectives for the biotechnological production of ethyl acetate by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, jun. 2014. Springer Verlag. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24788328>>. Acesso em: 10/3/2020.

LYTRA, G.; TEMPERE, S.; LE FLOCH, A.; DE REVEL, G.; BARBE, J. C. Study of sensory interactions among red wine fruity esters in a model solution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 36, p. 8504–8513, 2013. American Chemical Society.

MARZA, E.; CAMOUGRAND, N.; MANON, S. Bax expression protects yeast plasma membrane against ethanol-induced permeabilization. **FEBS Letters**, v. 521, n. 1–3, p. 47–52, 2002.

MATHEW, A. S.; WANG, J.; LUO, J.; YAU, S. T. Enhanced ethanol production via electrostatically accelerated fermentation of glucose using *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1–6, 2015. Nature Publishing Group.

MERTENS, S.; STEENSELS, J.; SAELS, V.; et al. A large set of newly created interspecific *Saccharomyces* hybrids increases aromatic diversity in lager beers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 23, p. 8202–8214, 2015. American Society for Microbiology.

MICHEL, M. **Use of non- *Saccharomyces* yeast for beer fermentation as illustrated by *Torulaspora delbrueckii*** “, 2017. TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN Forschungszentrum.

MICHEL, M.; KOPECKÁ, J.; MEIER-DÖRNBERG, T.; et al. Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. **Yeast**, v. 33, n. 4, p. 129–144, 2016. John Wiley and Sons Ltd. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/yea.3146>>. Acesso em: 26/2/2020.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA; PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. **Anuário da cerveja: 2019**. Brasília, 2019.

MIZOGUCHI, H.; HARA, S. Ethanol-induced alterations in lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of exogenous fatty acid. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 1, p. 12–16, 1997. Elsevier Sci B.V.

MUELLER, R. L. Genome biology and the evolution of cell-size diversity. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 11, 2015. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

NAKAO, Y.; KANAMORI, T.; ITOH, T.; et al. Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. **DNA Research**, v. 16, n. 2, p. 115–129, 2009.

NARZISS, L.; BACK, W.; GASTL, M.; ZARNKOW, M. **Abriss der Bierbrauerei**. Wiley, 2017.

NORDSTRÖM, K. Formation of esters from acids by Brewer's yeast: Formation from unsaturated acids [21]. **Nature**, 1966. Nature Publishing Group.

OLANIRAN, A. O.; HIRALAL, L.; MOKOENA, M. P.; PILLAY, B. Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 1, p. 13–23, 2017.

OLIVARES-MARIN, I. K.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J. C.; REGALADO-GONZALEZ, C.; MADRIGAL-PEREZ, L. A. *Saccharomyces cerevisiae* exponential growth kinetics in batch culture to analyze respiratory and fermentative metabolism. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2018, n. 139, 2018.



OSBURN, K.; AMARAL, J.; METCALF, S. R.; et al. Primary souring: A novel bacteria-free method for sour beer production. **Food Microbiology**, v. 70, p. 76–84, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.007>>. .

OUELLETTE, R. J. & RAWN, J. D. **Carbohydrates. Organic Chemistry**. Academic Press, 2018.

PASCUAL, C.; ALONSO, A.; GARCIA, I.; ROMAY, C.; KOTYK, A. Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes, and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, n. 3, p. 374–378, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18584761>>. Acesso em: 11/3/2020.

PÉREZ-TRAVÉS, L.; LOPES, C. A.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Evaluation of different genetic procedures for the generation of artificial hybrids in *Saccharomyces* genus for winemaking. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 2, p. 102–111, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22503711>>. Acesso em: 7/3/2020.

PETELKOV, I.; SHOPSKA, V.; DENKOVA-KOSTOVA, R.; KOSTOV, G.; LYUBENOVA, V. Investigation of different regimes of beer fermentation with free and immobilized cells. **Periodica Polytechnica Chemical Engineering**, v. 64, n. 2, p. 162–171, 2020.

PETER F. STANBURY, A. W. AND S. J. H. **Principles of Fermentation Technology**. Elsevier, 2017.

PETROV, V. V.; OKOROKOV, L. A. Increase of anion and proton permeability of *Saccharomyces carlsbergensis* plasmalemma by n-alcohols as a possible cause of its de-energization. **Yeast**, v. 6, n. 4, p. 311–318, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2168610>>. Acesso em: 11/3/2020.

PETZOLDT, T. Estimation of growth rates with package growthrates. **R Cran**, p. 1–8, 2017.

PHAM, T. N. L.; DOAN, N. H. D.; LE, V. V. M. Using fed-batch fermentation in very high gravity brewing: Effects of tween 80 and ergosterol supplementation on fermentation performance of immobilized yeast in calcium alginate gel. **International Food Research Journal**, v. 17, n. 4, p. 995–1002, 2010.

POWELL, C. D.; KERRUISH, D. W. M. Beer-Spoiling Yeasts: Genomics, Detection, and Control. **Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology**, 2017. Caister Academic Press.

POWELL, C. D.; QUAIN, D. E.; SMART, K. A. The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. **FEMS Yeast Research**, v. 3, n. 2, p. 149–157, 2003.

QUAIN, D. E. Yeast Supply, Fermentation, and Handling Insights, Best Practice and Consequences of Failure. **Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology**, 2017. Caister Academic Press.

REHM, H.-J.; REHM, H.-J. Mikrobiologie der Lebensmittel. **Industrielle Mikrobiologie**. p.560–576, 1967. Springer Berlin Heidelberg.

RENGER, R. S.; HATEREN, S. H. VA.; LUYBEN, K. C. A. M. THE FORMATION OF ESTERS AND HIGHER ALCOHOLS DURING BREWERY FERMENTATION; THE EFFECT OF CARBON DIOXIDE PRESSURE. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 98, n. 6, p. 509–513, 1992. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.1992.tb01137.x>>. Acesso em: 10/3/2020.

RISTOW, H.; SEYFARTH, A.; LOCHMANN, E. R. Chromosomal damages by ethanol and acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae* as studied by pulsed field

gel electrophoresis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 326, n. 2, p. 165–170, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7529880>>. Acesso em: 10/3/2020.

RODRIGUES, F.; CALDEIRA, M.; CÂMARA, J. S. Development of a dynamic headspace solid-phase microextraction procedure coupled to GC-qMSD for evaluation the chemical profile in alcoholic beverages. **Analytica Chimica Acta**, v. 609, n. 1, p. 82–104, 2008.

ROMANO, P.; MARCHESE, R.; LAURITA, C.; SALEANO, G.; TURBANTI, L. Biotechnological suitability of *Saccharomyces ludwigii* for fermented beverages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 451–454, 1999. Springer Netherlands.

ROSE, A. H. Physiology of Cell Aggregation: Flocculation by *Saccharomyces cerevisiae* As a Model System. **Microbial Adhesion and Aggregation**. p.323–335, 1984. Springer Berlin Heidelberg.

ROSSOUW, D.; BAGHERI, B.; SETATI, M. E.; BAUER, F. F. Co-Flocculation of Yeast Species, a New Mechanism to Govern Population Dynamics in Microbial Ecosystems. (D. Cullen, Org.) **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0136249, 2015. Public Library of Science. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0136249>>. Acesso em: 20/4/2020.

SALAZAR, A. N.; GORTER DE VRIES, A. R.; VAN DEN BROEK, M.; et al. Chromosome level assembly and comparative genome analysis confirm lager-brewing yeasts originated from a single hybridization. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 1–18, 2019. BMC Genomics.

SAMPAIO, J. P.; PONTES, A.; LIBKIND, D.; HUTZLER, M. Taxonomy, Diversity, and Typing of Brewing Yeasts. **Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology**, 2017. Caister Academic Press. Disponível em: <<http://www.caister.com/brewing>>. Acesso em: 24/2/2020.

SAN-JUAN, F.; FERREIRA, V.; CACHO, J.; ESCUDERO, A. Quality and aromatic sensory descriptors (mainly fresh and dry fruit character) of spanish red wines can be predicted from their aroma-active chemical composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 14, p. 7916–7924, 2011. American Chemical Society.

SANNINO, C.; MEZZASOMA, A.; BUZZINI, P.; TURCHETTI, B. Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application. **Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application**, 2019.

SANTA MARÍA, J. Utilization of saccharose and maltose by yeasts. **Nature**, nov. 1964.

SATO, M.; WATARI, J.; SHINOTSUKA, K. Genetic Instability in Flocculation of Bottom-Fermenting Yeast. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 59, n. 3, p. 130–134, 2001. Taylor & Francis. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1094/ASBCJ-59-0130>>. Acesso em: 27/2/2020.

SCHMITT, H. D.; CIRIACY, M.; ZIMMERMANN, F. K. The synthesis of yeast pyruvate decarboxylase is regulated by large variations in the messenger RNA level. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 192, n. 1–2, p. 247–252, 1983. Springer-Verlag.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDOERF, S.; et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 2012. National Academy of Sciences.

SKAŁA, J.; KOTYLAK, Z. Protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Microbiologica Polonica**, v. 33, n. 1, p. 25–35, 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8925003>>. Acesso em: 7/3/2020.

SLOUKA, C.; BRUNAUER, G. C.; KOPP, J.; et al. Low-frequency electrochemical impedance spectroscopy as a monitoring tool for yeast growth in industrial brewing processes. **Chemosensors**, v. 5, n. 3, 2017.

SMART, K. A. Yeast Stress and Brewing Fermentations. **Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology**, 2017. Caister Academic Press.

DE SMIDT, O.; DU PREEZ, J. C.; ALBERTYN, J. Molecular and physiological aspects of alcohol dehydrogenases in the ethanol metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 1, p. 33–47, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094012>>. Acesso em: 9/3/2020.

SPEERS, A.; FORBES, J. Yeast: An overview. **Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste**. p.3–9, 2015. Elsevier.

STEENSELS, J.; DAENEN, L.; MALCORPS, P.; et al. Brettanomyces yeasts - From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 206, p. 24–38, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005>>. .

STEVENSON, K.; MCVEY, A. F.; CLARK, I. B. N.; SWAIN, P. S.; PILIZOTA, T. General calibration of microbial growth in microplate readers. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–7, 2016. Nature Publishing Group.

STEWART, G. G. The Horace Brown Medal lecture: Forty years of brewing research. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, n. 1, p. 3–29, 2009.

STEWART, G. G. **Brewing and Distilling Yeasts**. Cham: Springer International Publishing, 2017.

STEWART, G. G. Yeast flocculation—sedimentation and flotation. **Fermentation**, 16. abr. 2018. MDPI AG.

STEWART, G. G.; HILL, A. E.; RUSSELL, I. 125th Anniversary Review: Developments in brewing and distilling yeast strains. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, n. 4, p. 202–220, 2013. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jib.104>>. Acesso em: 8/3/2020.

TECHNICAL COMMITTEE, A. Yeast-11 Flocculation. **ASBC Methods of Analysis**, v. 5, n. c, p. 11–12, 2011. Disponível em: <<http://www.asbcnet.org/moa/summaries/Yeast-11.aspx>>. .

THESELING, F. A.; BIRCHAM, P. W.; MERTENS, S.; VOORDECKERS, K.; VERSTREPEN, K. J. A Hands-On Guide to Brewing and Analyzing Beer in the Laboratory. **Current protocols in microbiology**, v. 54, n. 1, p. e91, 2019. NLM (Medline). Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cpmc.91>>. Acesso em: 22/2/2020.

TOLIENG, V.; KUNTHIPHUN, S.; SAVARAJARA, A.; TANASUPAWAT, S. Diversity of yeasts and their ethanol production at high temperature. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 2, p. 136–142, 2018. Open Science Publishers LLP Inc.

TOURNIER, C.; SULMONT-ROSSE, C.; GUICHARD, E. Flavour perception: aroma, taste and texture interactions. **Food**, v. 1, n. 2, p. 246–257, 2007. Disponível em: <[http://www.globalsciencebooks.info/Journals/images/GSB\\_EditorBoards.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Journals/images/GSB_EditorBoards.pdf)>. .

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; COGHE, S.; et al. Bioflavoring and beer refermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 2–3, p. 140–

150, 2003.

VERSTREPEN, K. J.; DERDELINCKX, GUY; DUFOUR, J. P.; et al. Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2003. Society of Fermentation and Bioengineering.

VERSTREPEN, K. J.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H.; DELVAUX, F. R. Yeast flocculation: What brewers should know. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 25. jan. 2003. Springer Verlag.

VIDGREN, V. **Maltose and maltotriose transport into ale and lager brewer's yeast strains**. 2010.

VURALHAN, Z.; MORAIS, M. A.; TAI, S. L.; PIPER, M. D. W.; PRONK, J. T. Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4534–4541, 2003.

WALKER, G.; STEWART, G. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 30, 2016.

WARRINGER, J.; ZÖRGÖ, E.; CUBILLOS, F. A.; et al. Trait Variation in Yeast Is Defined by Population History. (L. Kruglyak, Org.) **PLoS Genetics**, v. 7, n. 6, p. e1002111, 2011. Public Library of Science. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1002111>>. Acesso em: 7/3/2020.

WEYERMANN® SPECIAL MALTS. **Product: Weyermann® Bavarian Pilsner Liquid Malt Extract**. Bamberg, 2019.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Yeast: the practical guide to beer fermentation**. Brewers Publications, 2010.

WINSTON, F. EMS and UV mutagenesis in yeast. **Current Protocols in Molecular Biology**, abr. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425760>>. Acesso em: 7/3/2020.

WISECAVER, J. H.; SLOT, J. C.; ROKAS, A. The Evolution of Fungal Metabolic Pathways. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 12, p. e1004816, 2014. Public Library of Science.

WLP603 *Torulaspora delbrueckii* | White Labs. Disponível em: <<https://whitelabs.com/yeast-bank/wlp603-torulaspora-delbrueckii>>. Acesso em: 2/3/2020.

WOLFGANG, K. Wolfgang Kunze Technology brewing and malting. , 2004.

WOLFGANG, K. **Technology brewing and malting**. 6th English ed. VLB Berlin, 2019.

YAKOPSON, C. *Brettanomyces* Dissertation «The Brettanomyces Project». Disponível em: <<http://brettanomycesproject.com/dissertation/>>. Acesso em: 10/3/2020.

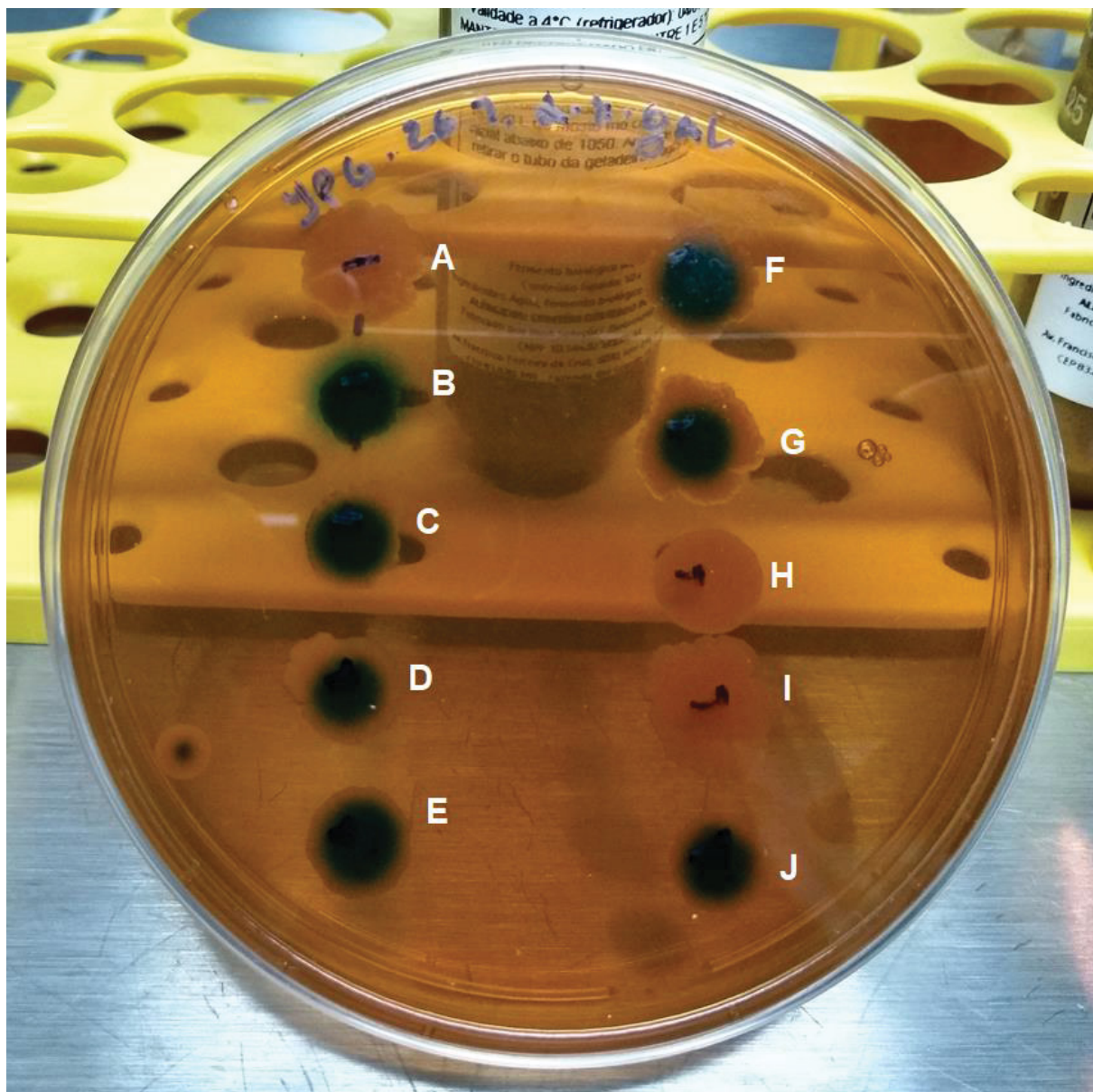
ZADRAG-TECZA, R.; KWOLEK-MIREK, M.; ALABRUDZIŃSKA, M.; SKONECZNA, A. Cell size influences the reproductive potential and total lifespan of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast as revealed by the analysis of polyploid strains. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.

ZAKHARTSEV, M.; REUSS, M. Cell size and morphological properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in relation to growth temperature. **FEMS Yeast Research**, v. 18, n. 6, 2018. Oxford Academic.



## ANEXO 1 – IMAGENS

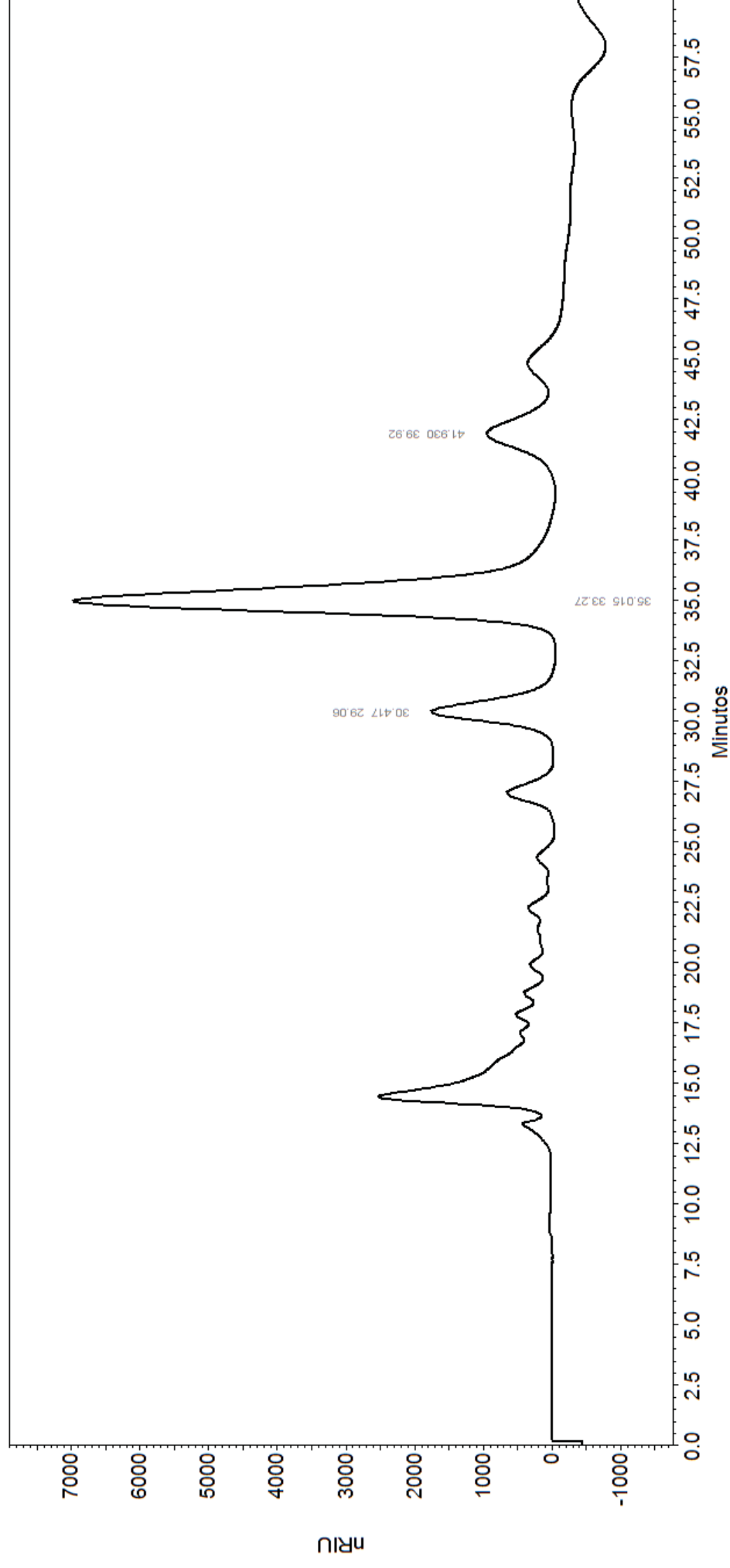
### A. Crescimento em meio sólido *Yeast peptone D-Galactose*



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Culturas das linhagens em investigação após incubação por 7 dias, para ensaio de assimilação de melibiose. (A) MARA1, (B) PM01, (C) MC1, (F) SY001, (G) SY004, (H) PA09, (I) PA10, (J) Coroa R.

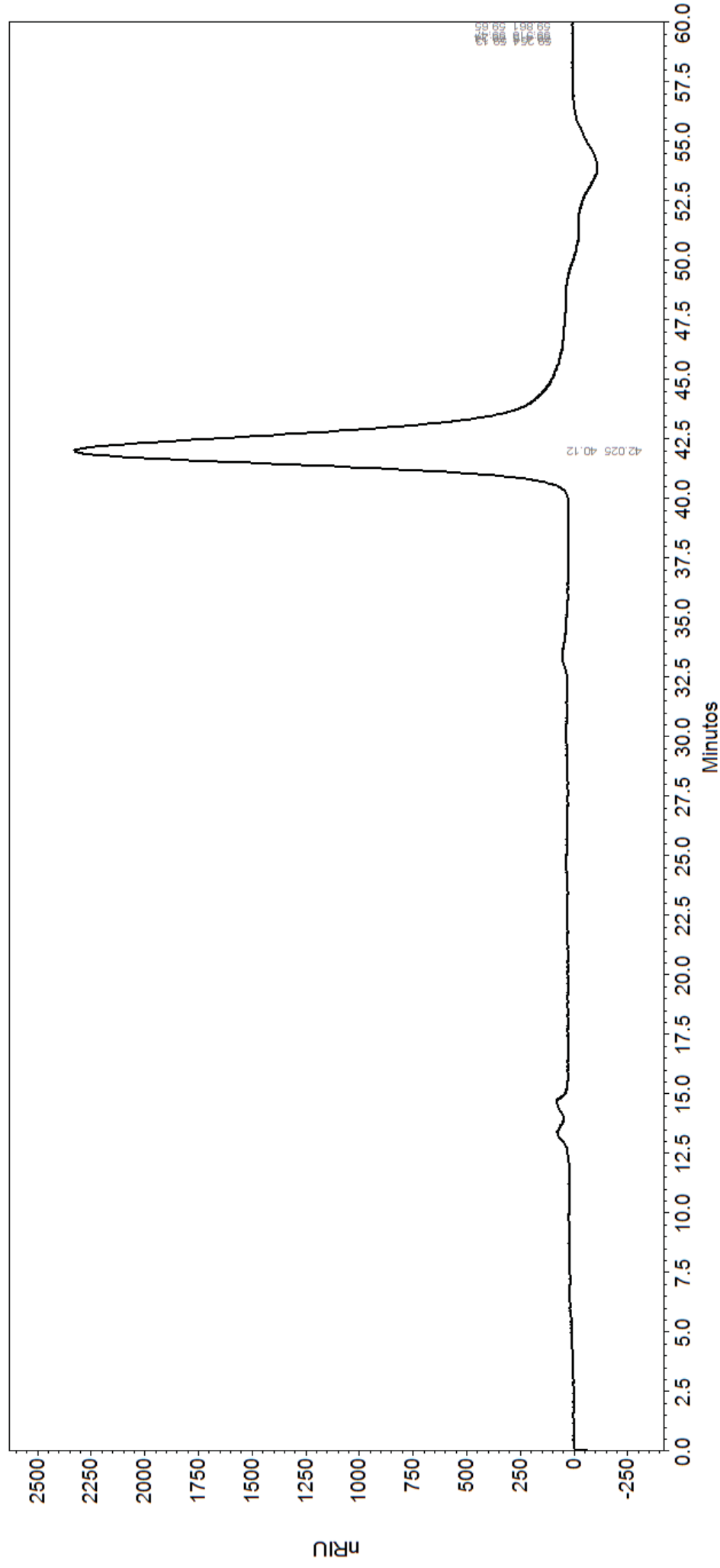
## B. CROMATOGRAMA DE HPLC-RID DO MOSTO NÃO-FERMENTADO



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Cromatograma com destaque para os picos de maltotriose (30,417 min), maltose (35,015 min), e glucose (41,930 min).

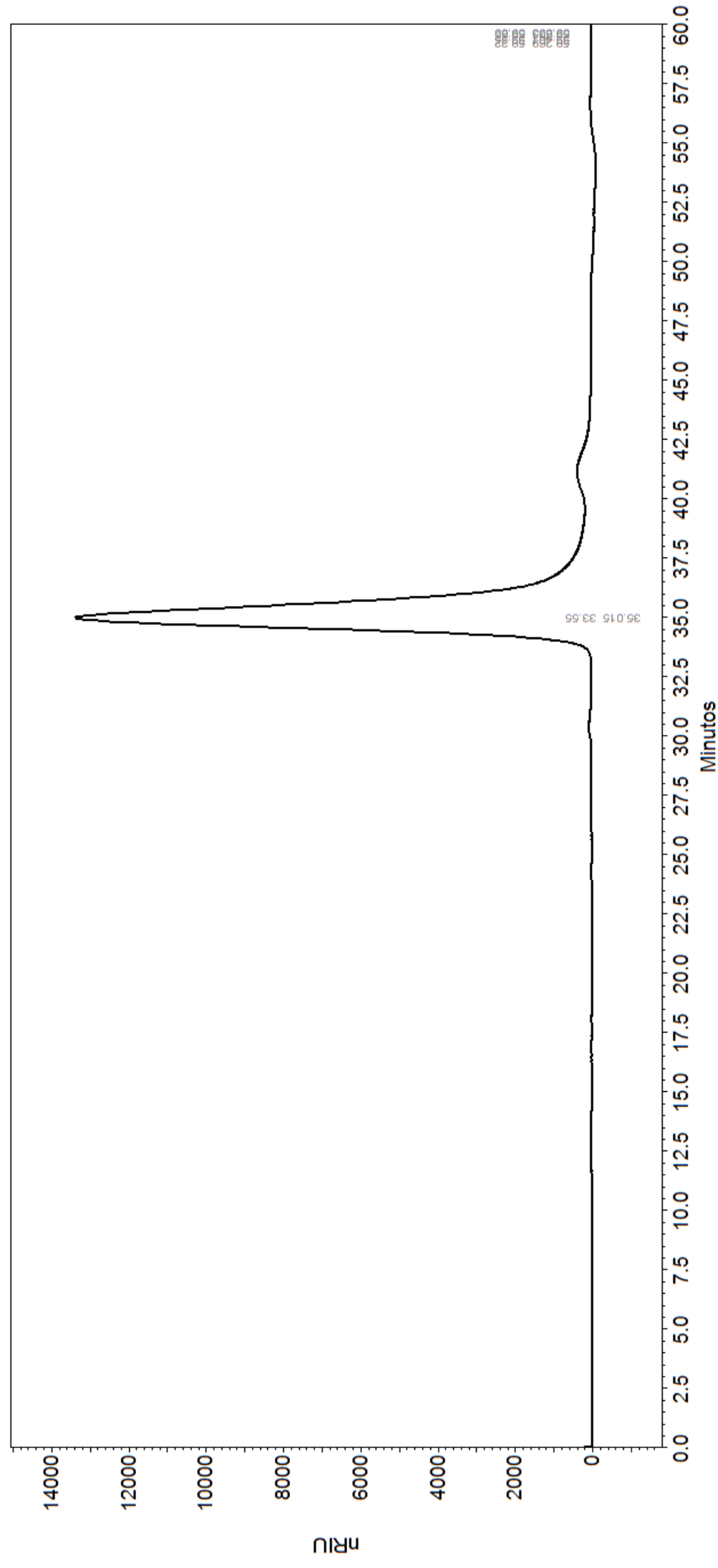
C. CROMATOGRAMA HPLC-RID DO PADRÃO DE GLUCOSE



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Cromatograma com destaque para o pico de glucose em 42'025", padrão em concentração de 4 mg/mL.

## D. CROMATOGRAMA DE HPLC-RID DO PADRÃO MALTOSE

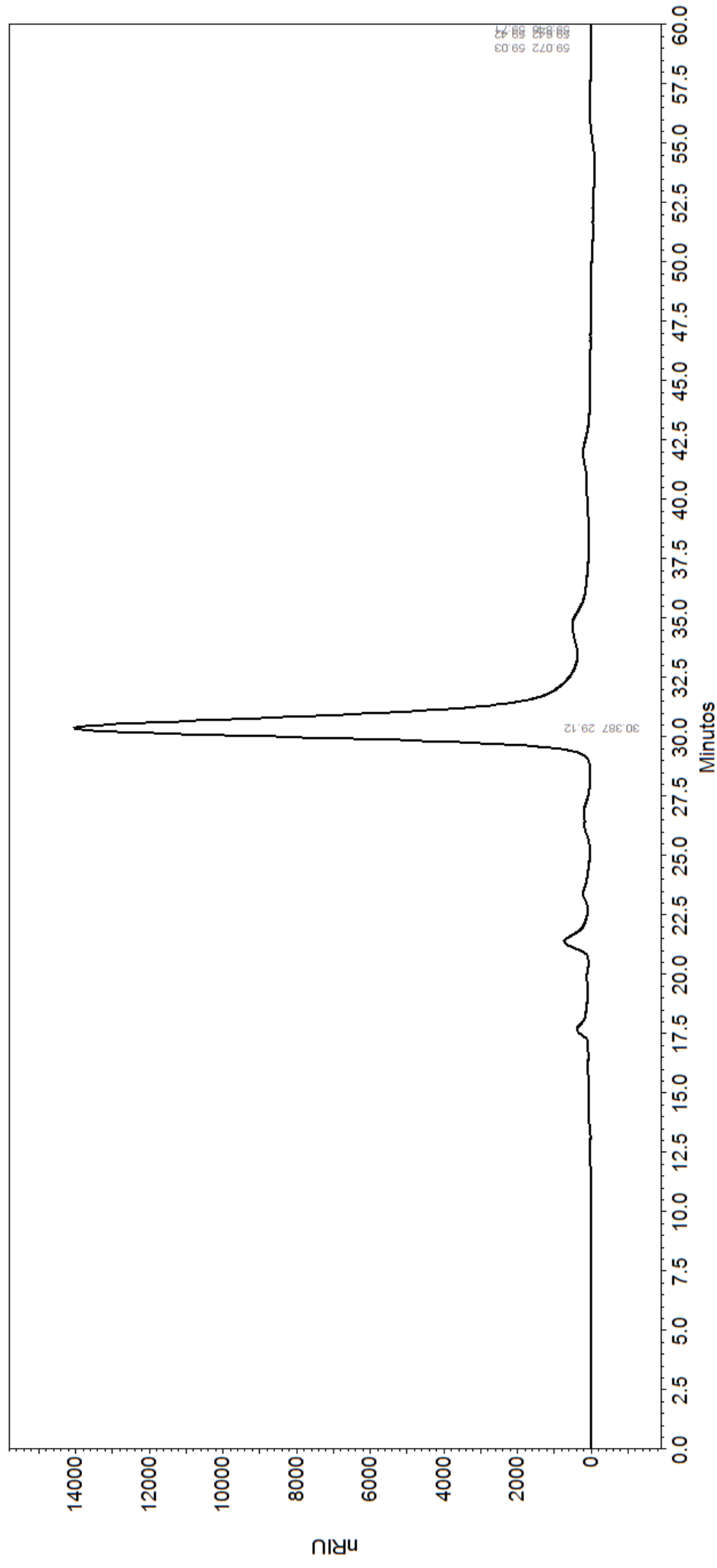


FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: Cromatograma com destaque para o pico relativo ao padrão de maltose (35,015 min), padrão Sigma [2 mg/L].



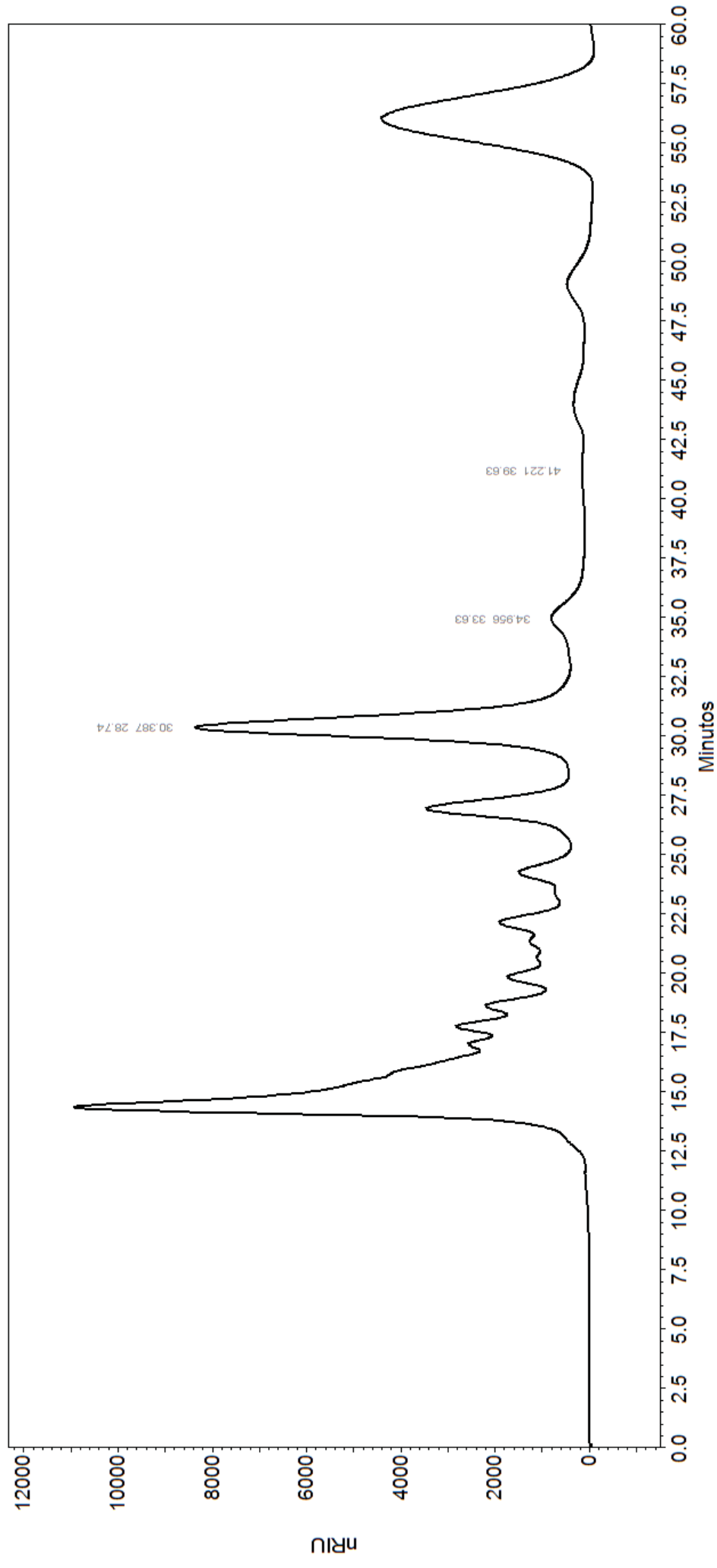
E. CROMATOGRAMA DE HPLC-RID DO PADRÃO MALTOTRIOSE



FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: Cromatograma da maltotriose (30,387 min); padrão Sigma [2 mg/mL].

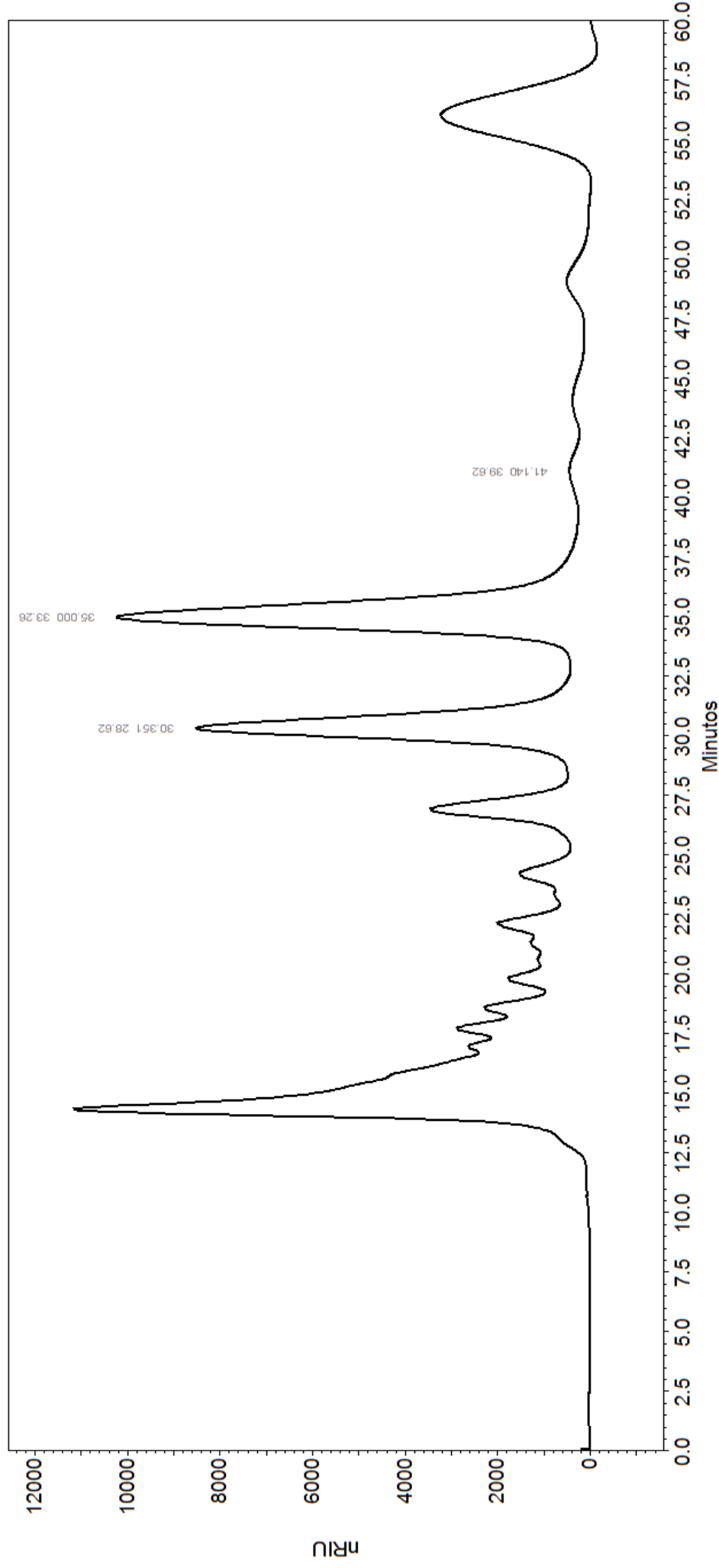
F. CROMATOGRAMA DE HPLC-RID DO MOSTO FERMENTADO PELA CEPA PA09



FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: Cromatograma com destaque para os picos de maltotriose em (30,387); maltose (34,956) e glucose (41,221 min).

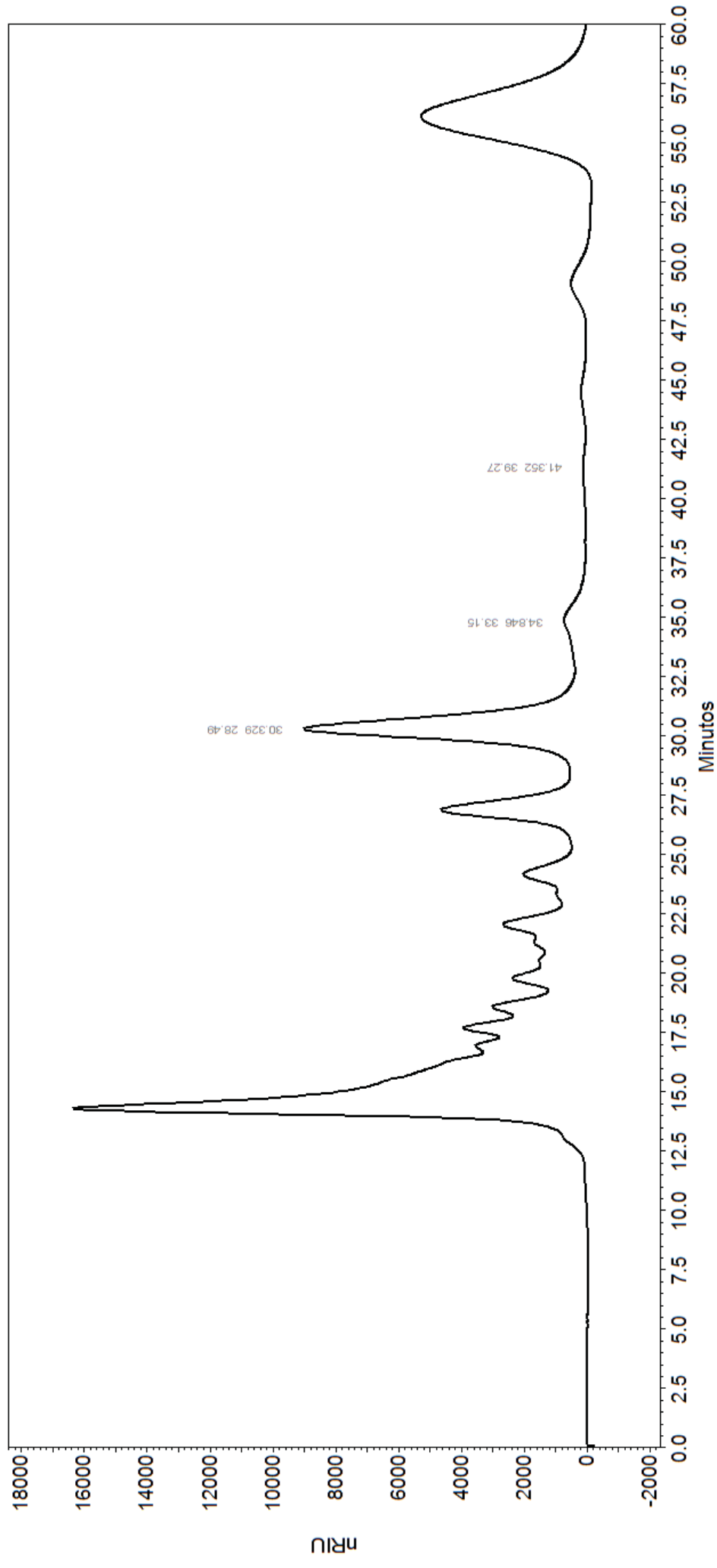
G. CROMATOGRAMA DE HPLC-RID DO MOSTO FERMENTADO PELA CEPA PA10



FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: Cromatograma com destaque para os picos de maltotriose (30,351 min), maltose (35,000 min) e glucose (41,140 min)

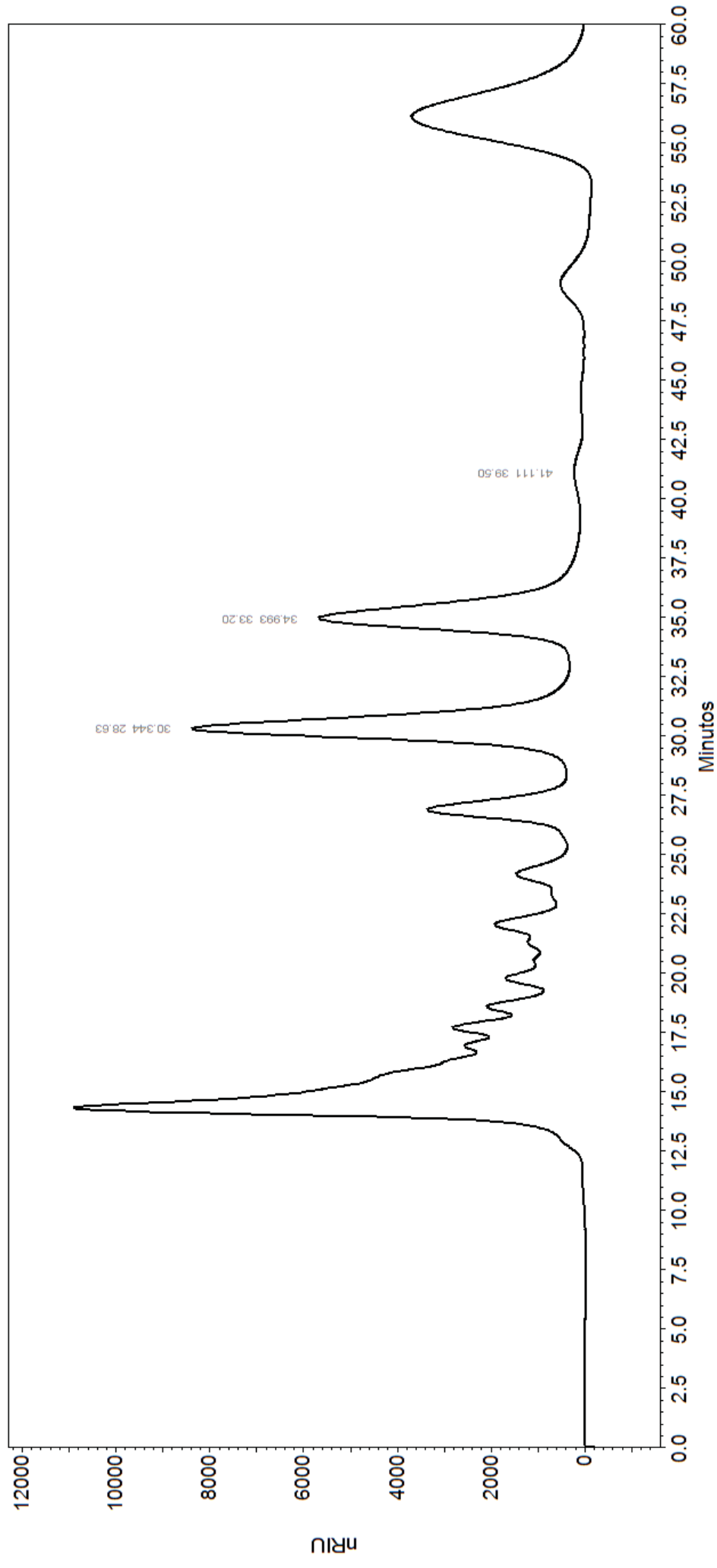
## H. CROMATOGRAMA DE HPLC-RID DO MOSTO FERMENTADO PELA CEPA MARA01



FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: Cromatograma com destaque para os picos de maltotriose (30,329 min), maltose (34,846 min) e glucose (41,362 min).

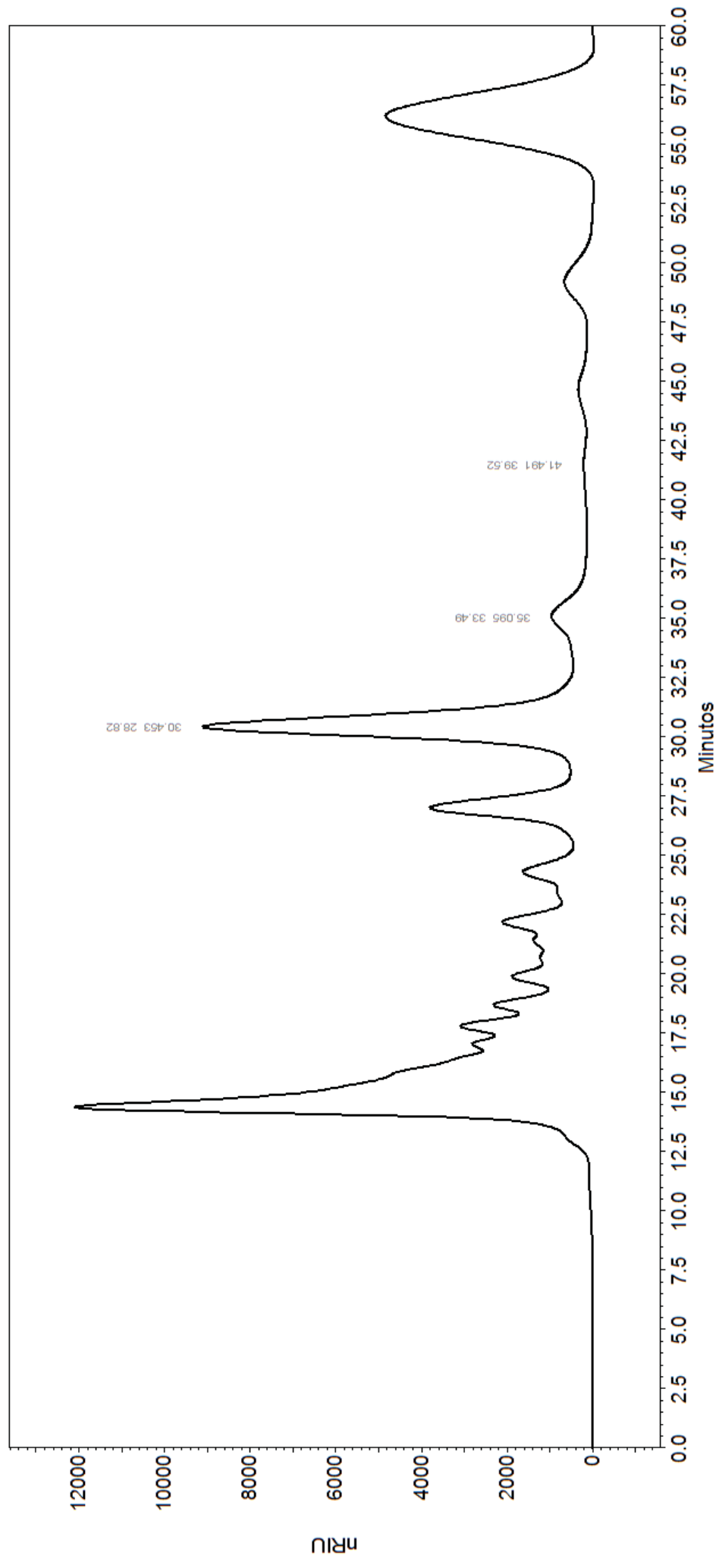
## I. CROMATOGRAMA DE HPLC-RID DO MOSTO FERMENTADO PELA CEPA MC1



FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: Cromatograma com destaque para os picos de maltotriose (30'344 min) maltose (34,993 min), e glucose (41,111 min).

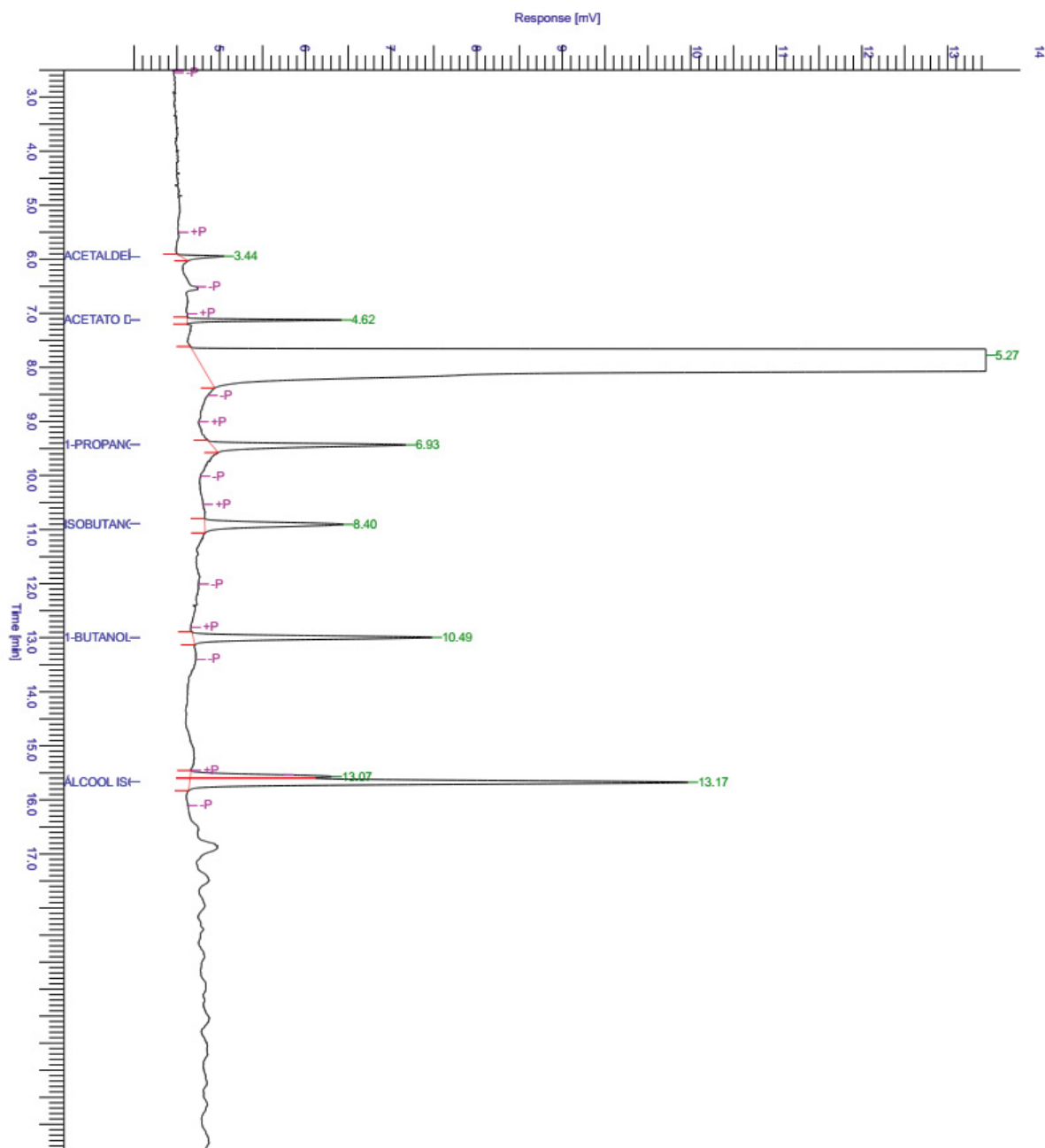
## J. CROMATOGRAMA DE HPLC-RID DO MOSTO FERMENTADO PELA CEPA PM01



FONTE: O autor (2020).

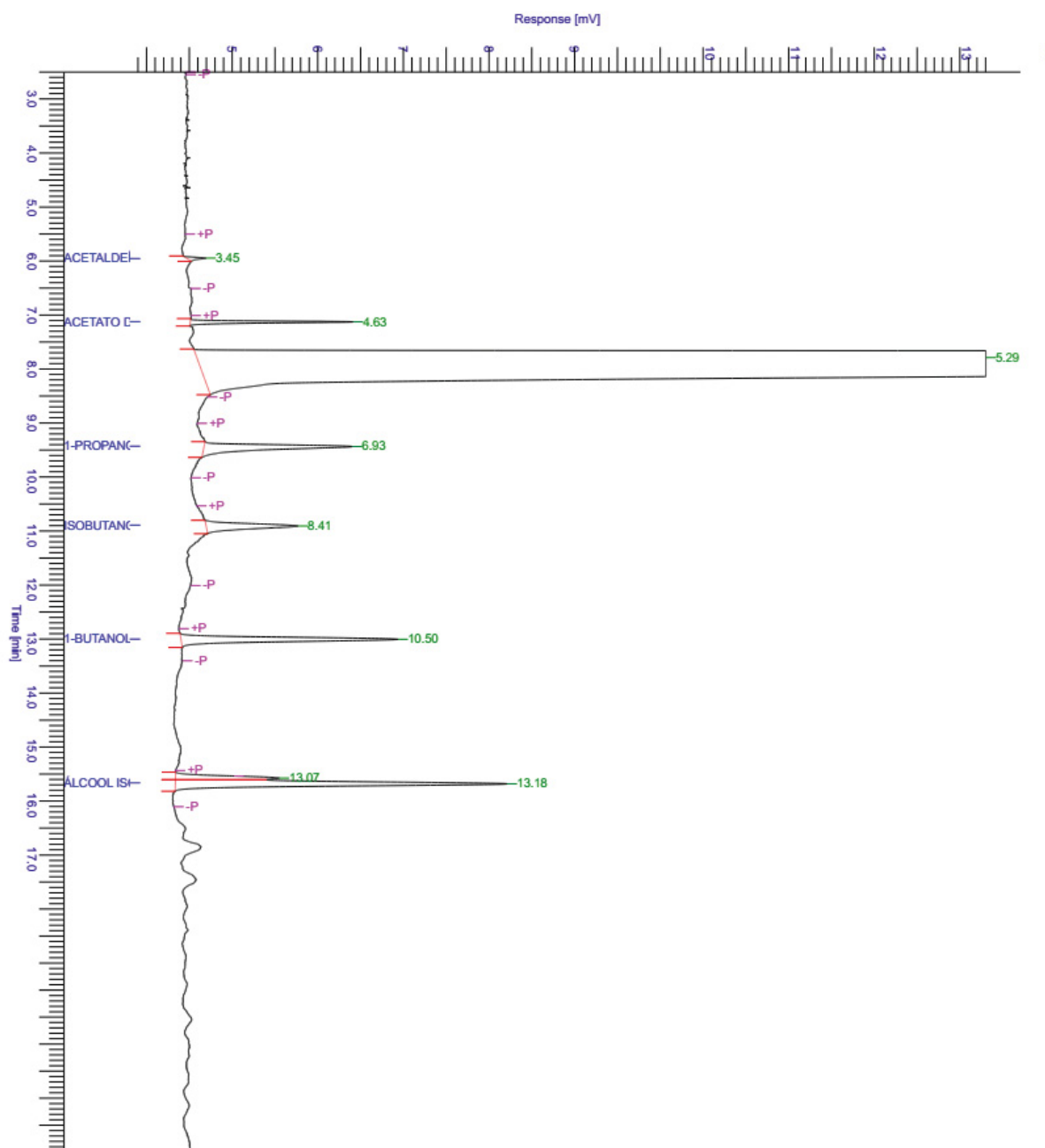
LEGENDA: Cromatograma com destaque para os picos de maltotriose (30,453 min), maltose (35,095 min) e glucose (41,491 min).

# K. CROMATOGRAMA GC-FID DA DESTILAÇÃO DO MOSTO FERMENTADO PELA CEPA PA09



FONTE: O autor (2020).

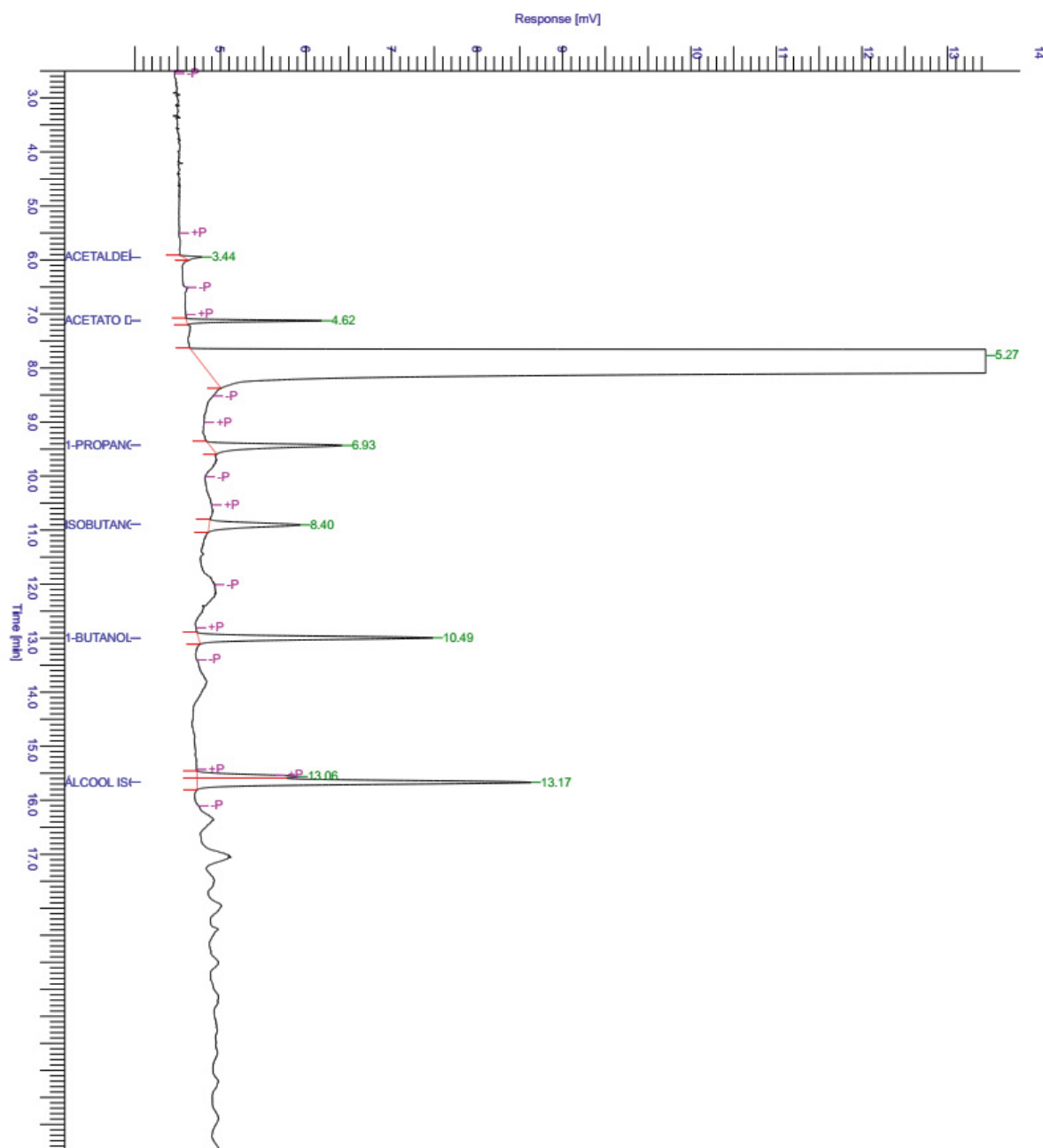
# L. CROMATOGRAMA GC-FID DA DESTILAÇÃO DO MOSTO FERMENTADO PELA CEPA PA10



FONTE: O autor (2020).

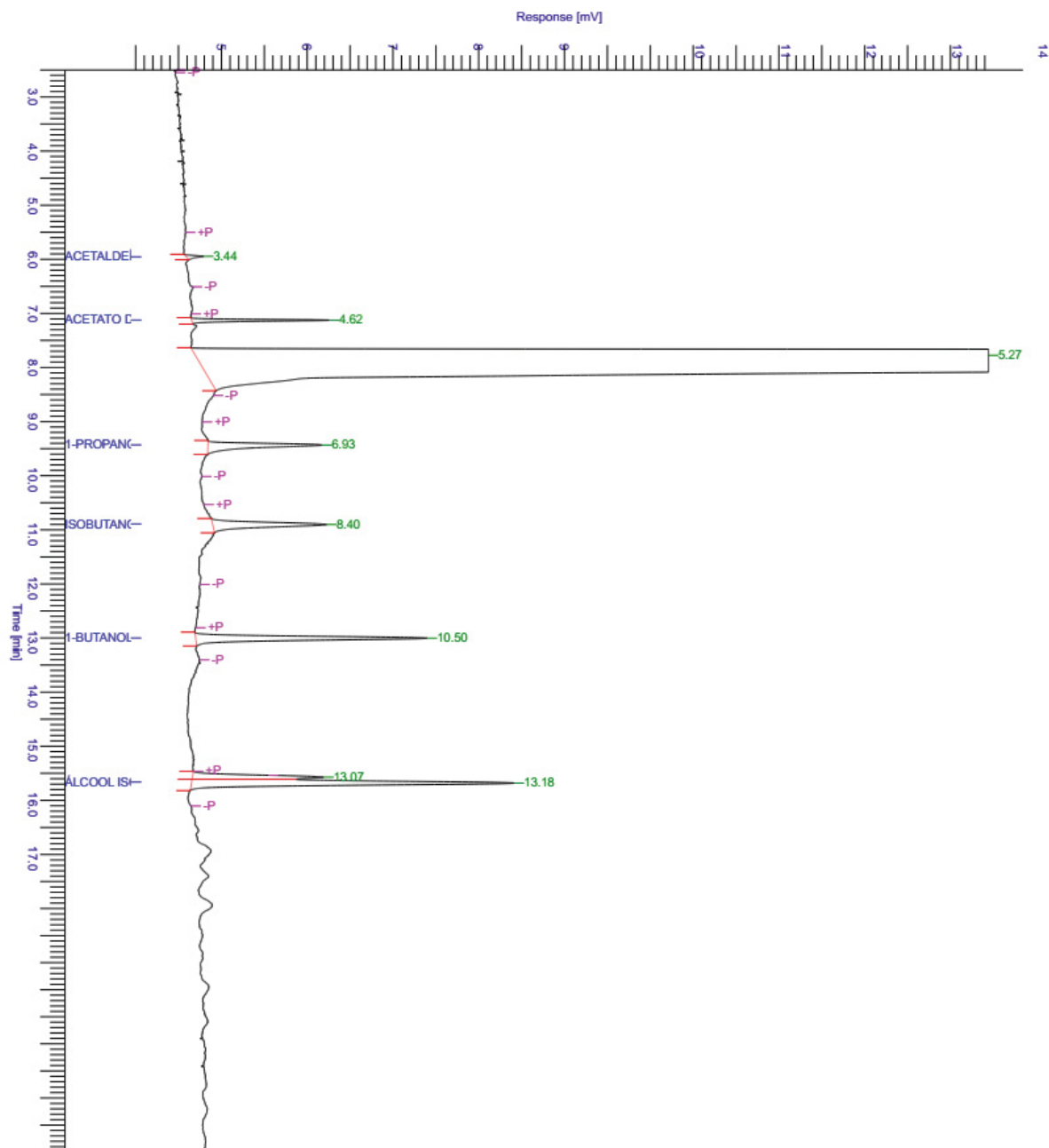


# M. CROMATOGRAMA GC-FID DA DESTILAÇÃO DO MOSTO FERMENTADO PELA CEPA MARA1



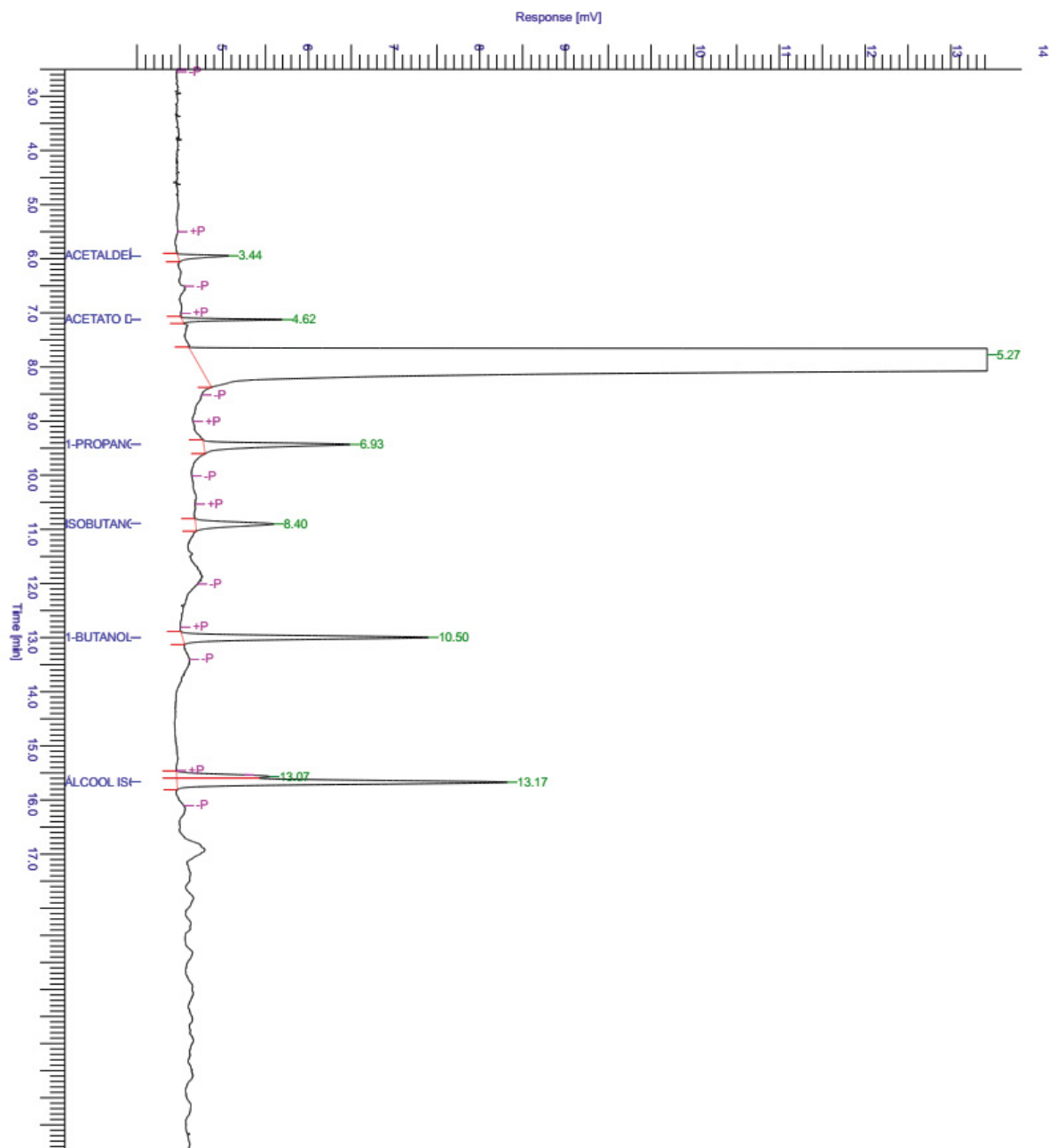
FONTE: O autor (2020).

# N. CROMATOGRAMA GC-FID DA DESTILAÇÃO DO MOSTO FERMENTADO PELA CEPA MC1



FONTE: O autor (2020).

# O. CROMATOGRAMA GC-FID DA DESTILAÇÃO DO MOSTO FERMENTADO PELA CEPA PM01



FONTE: O autor (2020).

## ANEXO 2 – CODIGO R

Código usado em plataforma de linguagem R para processamento de dados relativos a taxa de crescimento específica máxima ( $\mu_{\max}$ ):

```
##mumax methodology
##Importing Data from 96 microplate
Plate <- read.table("file:///C:/Users/adm/File/Data(raw).csv"
                    , header = TRUE,
                    sep = ";", dec = ",")

str(Plate)
View(Plate)

#Using GrowthCurve Pack to plot each well growth Curve
library(growthcurver)
A5 <- SummarizeGrowth(Plate$Time, Plate$A5)
A5
plot (A5)

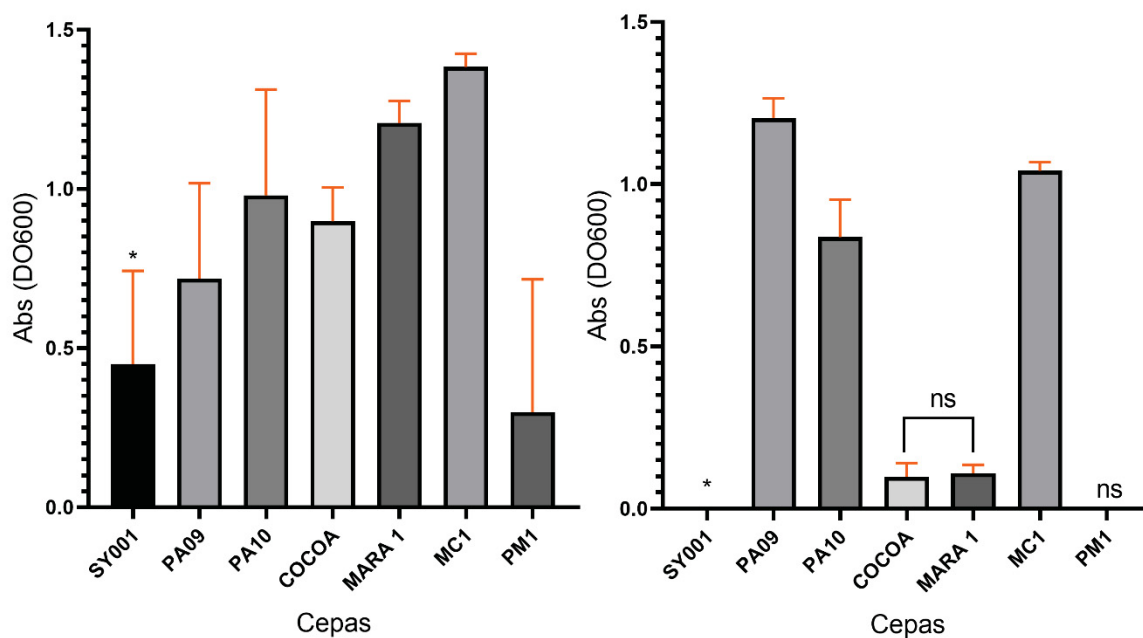
library (growthrates)
fitA5 <- fit_easylinear(Plate$Time, Plate$A5, h = 15, quota = 0.95)
par(mfrow =c(1, 2))
plot (fitA5)
plot (fitA5, log = "y")
coef(fitA5)

fitA6 <- fit_easylinear(Plate$Time, Plate$A6, h = 15, quota = 0.95)
par(mfrow =c(1, 2))
plot (fitA6)
plot (fitA6, log = "y")
coef(fitA5)

fitA11 <- fit_easylinear(Plate$Time, Plate$A11, h = 15, quota = 0.95)
par(mfrow =c(1, 2))
plot (fitA11)
plot (fitA11, log = "y")
coef(fitA11)
```

### ANEXO 3 – TABELAS E GRÁFICOS

#### A. Tolerância alcoólica em comparação com cepa SY001

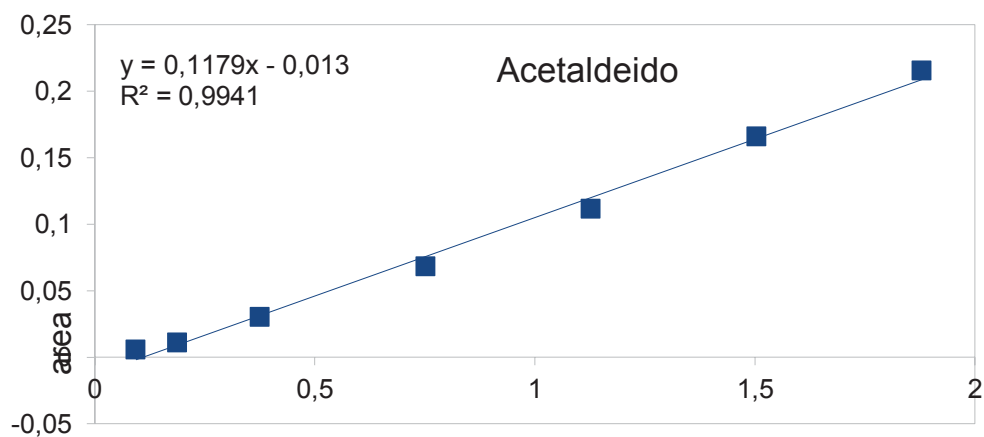


Fonte: Autor (2020)

LEGENDA: Gráfico com estatística da tolerância alcoólica.

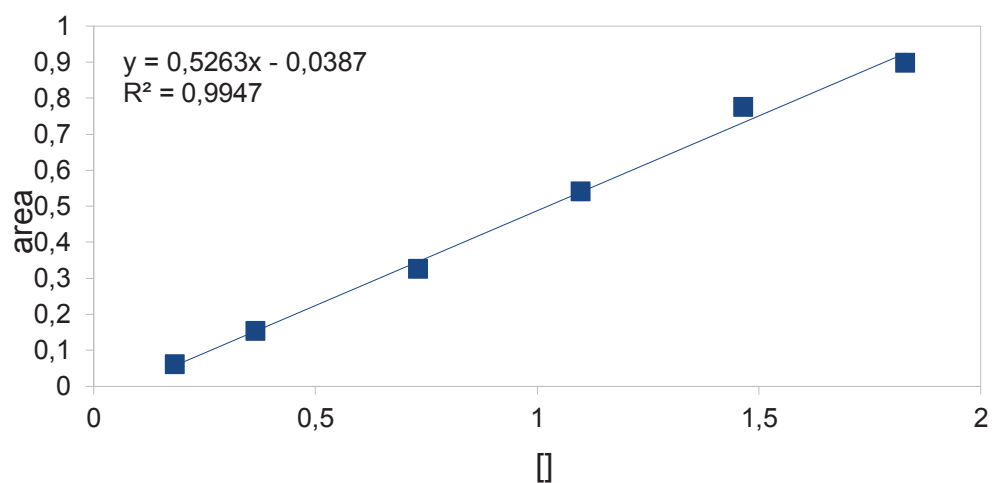
(A) 5% e (B) 10%

#### B. Curvas de calibração de compostos carbonílicos, acetato e álcoois superiores

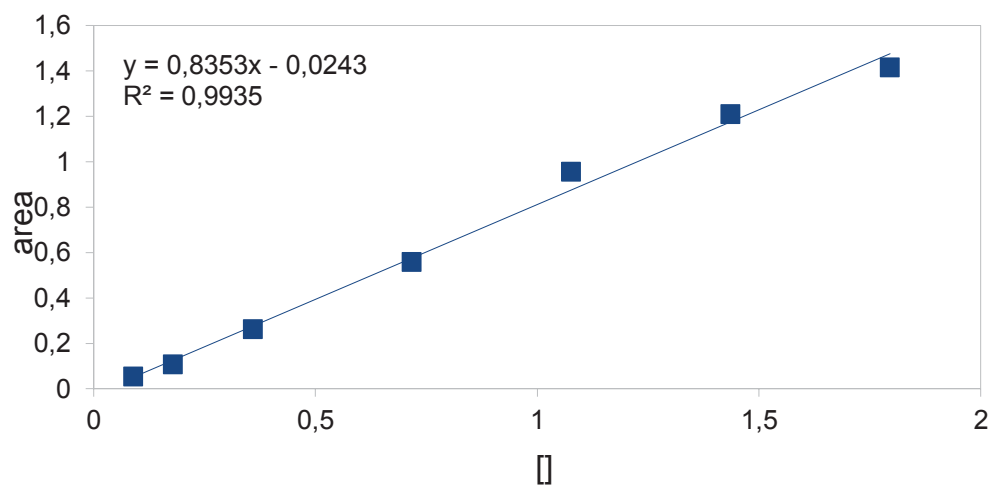


[ ]

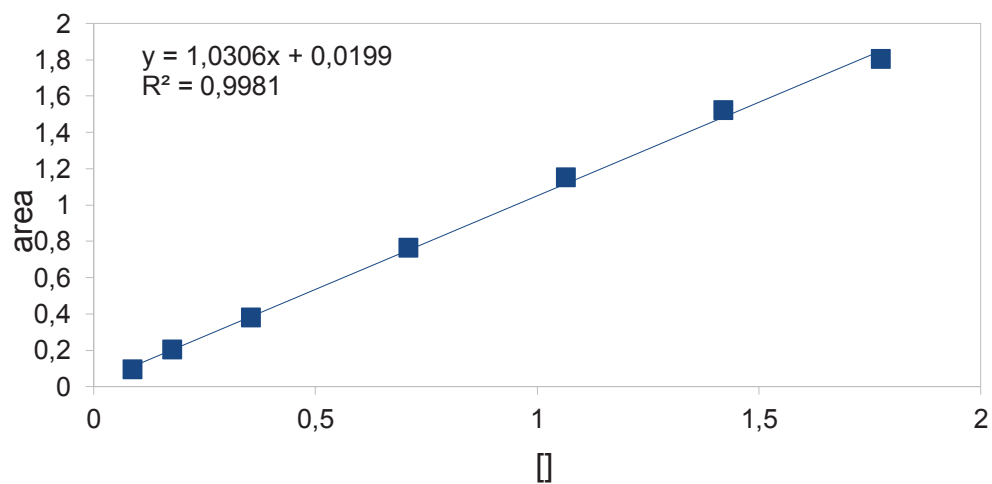
## Acetato de etila



## 1-propanol



## Alcoól Isoamílico



## Isobutanol

